PCT

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL Oficina Internacional



SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ :

C12N 15/80, 15/53, 15/56, 9/06, 9/24

(11) Número de publicación internacional:

WO 98/39459

(43) Fecha de publicación internacional:

11 de Septiembre de 1998 (11.09.98)

(21) Solicitud internacional:

PCT/ES98/00056

A1

(22) Fecha de la presentación internacional:

5 de Marzo de 1998 (05.03.98)

(30) Datos relativos a la prioridad:

P 9700482

5 de Marzo de 1997 (05.03.97) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
ANTIBIOTICOS, S.A.U. [ES/ES]; Avenida de Burgos, 8-A,
E-28036 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/solicitantes (sólo US): BARREDO FUENTE, José Luis [ES/ES]; Calle Moisés de León, 15-2°B, E-24006 León (ES). RODRIGUEZ SAIZ, Marta [ES/ES]; Calle Tui, 6, 1°C, E-36209 Vigo (ES). MORENO VALLE, Miguel Angel [ES/ES]; Calle Juan de la Cosa, 3-6°A, E-24009 León (ES). COLLADOS DE LA VIEJA, Alfonso J. [ES/ES]; Calle Valcarce, 3-3°C, E-24010 León (ES). SALTO MALDONADO, Francisco [ES/ES]; Calle del Abrego, 33-2°C, Prado de Somosaguas, E-28023 Madrid (ES). DIEZ GARCIA, Bruno [ES/ES]; Calle Generalisimo Franco, 7, Trobajo del Cerecedo, E-24192 León (ES).

(74) Mandatario: DE ELZABURU MARQUEZ, Alberto; Calle Miguel Angel, 21, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada

Con informe de búsqueda internacional.

(54) Title: PROMOTERS OF THE GENES GLUTAMATE DESHYDROGENASE, β -N-ACETYLHEXOSAMINIDASE AND \$b(g)-ACTINE, AND THEIR USE IN SYSTEMS OF EXPRESSION, SECRETION AND ANTI-SENS IN FILAMENTARY FUNGI

(54) Título: PROMOTORES DE LOS GENES GLUTAMATO DESHIDROGENASA, β -N-ACETILHEXOSAMINIDASA γ -ACTINA Y SU UTILIZACION EN SISTEMAS DE EXPRESION, SECRECION Y ANTISENTIDO DE HONGOS FILAMENTOSOS

(57) Abstract

The invention relates to promoters of the genes glutamate desydrogenase. β -acetylhexosaminidase and γ -actine and their use in systems of expression, secretion and anti-sens of filamentary funghi. The invention also relates to the use of the promoters of the genes which code: (I) glutamate desydrogenase NADP depending (EC.1.4.1.4) of Penicillium chrysogenum, (II) γ -N-actylhexosaminidase (EC.3.2.1.52) of Penicillium chrysogenum and (III) γ -actine of Penicillium chrysogenum and Acrimonium chrysogenum, which can be used for the construction of potent vectors of expression and secretion useful both for P. chrysogenum and for A. chrysogenum and related species. Said promoters can also be used for blocking the genic expression through anti-sens construction. Under the control of the above mentioned promoters, it is possible to conduct the expression of other genes in filamentary fungi, thereby increasing the production of antibiotics and/or proteins inherent to the same.

(57) Resumen

Promotores de los genes glutamato deshidrogenasa, β -N-acetilhexosaminidasa y γ -actina y su utilización en sistemas de expresión, secreción y antisentido de

Sall

Sall

Sacl

hongos filamentosos. Se describe la utilización de los promotores de los genes que codifican: (I) glutamato deshidrogenasa NADP dependiente (EC.1.4.1.4) de *Penicillium chrysogenum*, (II) β -N-acetilhexosaminidasa (EC.3.2.1.52) de *Penicillium chrysogenum* y (III) γ -actina de *Penicillium chrysogenum* y *Acremonium chrysogenum*, los cuales pueden ser utilizados para la construcción de potentes vectores de expresión y secreción útiles tanto para *P. chrysogenum* como para *A. chrysogenum* y especies relacionadas. Asimismo, estos promotores pueden utilizarse para el bloqueo de la expresión génica mediante construcciones antisentido. Bajo el control de los promotores anteriormente citados se puede dirigir la expresión de otros genes en hongos filamentosos, incrementándose la producción de antibióticos y/o proteínas inherentes a los mismos.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
ΑZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia		Macedonia	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	ML	Malí	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benin	IE	Irlanda	MN	Mongolia	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus ·	IS	Islandia	MW	Malawi	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	MX	México	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NE	Níger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Países Bajos	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NO	Noruega	zw	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular	NZ	Nueva Zelandia		
CM-	Camerún		Democrática de Corea	PL	Polonia		
CN	China	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CZ	República Checa	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
DE	Alemania	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DK	Dinamarca	LK	Sri Lanka	SE	Suecia .		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapur		

- 1 -

PROMOTORES DE LOS GENES GLUTAMATO DESHIDROGENASA, β -N-ACE-TILHEXOSAMINIDASA Y γ -ACTINA Y SU UTILIZACION EN SISTEMAS DE EXPRESION. SECRECION Y ANTISENTIDO DE HONGOS FILAMENTOSOS

Campo de la invención

La invención se adscribe al campo técnico de la expre-5 sión de los genes gdh y hex de Penicillium chrysogenum y del gen act también de P. chrysogenum y de Acremonium chrysogenum. Del análisis de la secuencia nucleotídica de dichos genes, se deduce la existencia de una región promotora que 10 incluye el lugar de inicio de la traducción, la cual puede ser utilizada para la construcción de potentes vectores de expresión y secreción útiles tanto para P. chrysogenum como para A. chrysogenum y especies relacionadas. Asimismo, estos promotores pueden utilizarse para el bloqueo de la expresión 15 génica mediante construcciones antisentido. Bajo el control de los promotores anteriormente citados se puede dirigir la expresión de otros genes en hongos filamentosos, incrementándose la producción de antibióticos y/o proteínas, inherente a los mismos.

20 <u>Estado de la técnica</u>

P. chrysogenum y A. chrysogenum son hongos filamentosos industrialmente interesantes debido a su capacidad para producir penicilina y cefalosporina respectivamente. El desarrollo de técnicas de manipulación genética aplicables en ambos microorganismos ha sido potenciado durante la última década. Entre las técnicas de manipulación genética de P. chrysogenum y A. chrysogenum se encuentran la transformación de protoplastos con vectores que utilizan como marcador de

1.2.1.

- 2 -

selección el gen de resistencia a fleomicina (a partir de ahora denominado gen ble^{R}) (Kolar, M. et al. (1988). Gene 62, 127-134), así como la expresión de copias adicionales intactas de genes de interés y la sustitución del promotor del gen en cuestión por otro promotor capaz de mejorar su expresión. La expresión en hongos como P. chrysogenum o A. chrysogenum de genes homólogos puede estar regulada negativamente, mientras que en el caso de genes heterólogos, su promotor puede no ser reconocido eficientemente por dichos hongos. Con la finalidad de evitar estos problemas, se ha procedido a la identificación y clonación de genes que se expresen constitutivamente y en los que preferiblemente dicha expresión no presente regulación catabólica negativa, son los denominados a partir de ahora promotores fuertes. En general, se considera que los genes de alta expresión poseen señales en la región promotora que facilitan unos elevados niveles de transcripción y que fundamentalmente participan en funciones implicadas en el metabolismo primario celular. Entre estos genes se pueden citar: los genes que codifican para glutamato deshidrogenasa NADP dependiente (EC.1.4.1.4) (a partir de ahora denominado gen gdh), β -N-acetilhexosaminidasa (EC.3.2.1.52) (a partir de ahora denominado gen hex) y γ-actina (a partir de ahora denominado gen act).

Existen citas previas de los genes gdh, hex y act procedentes de microorganismos diferentes a los que se utilizan
en la presente invención. Entre la bibliografía más relevante cabe citar: (I) la secuencia nucleotídica del gen gdh del
hongo Neurospora crassa (Kinnaird, J.H. and Fincham, J.R.S.
(1983). Gene 26, 253-260) así como la regulación de la expresión del gen gdhA de Aspergillus nidulans (Hawkins, A.R.
et al. (1989). Mol. Gen. Genet. 418, 105-111), (II) la clo-

5

10

15

- 3 -

nación y expresión del gen hex1 de Candida albicans (Cannon, R.D. et al.(1994). J. Bacteriol. 2640-2647) y (III) la caracterización del gen act de A. nidulans (Fidel, S. et al. (1988). Gene 70, 283-293). La expresión de genes heterólogos en P. chrysogenum utilizando los promotores de los genes pcbC o penDE fue descrita por Cantwell, C.A. et al. en 1992 (Proc. R. Soc. London Ser. B 248, 283-289). Asimismo, también ha sido descrita la expresión de genes heterólogos en A. chrysogenum utilizando los promotores del gen β-isopropil malato deshidrogenasa (Japanese Patent Laid Open Publication No. 80295/1989) y gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (European Patent Application 0376226A1/1989).

La inactivación de la expresión génica en cepas industriales es en ocasiones necesaria para la eliminación de ac-15 tividades enzimáticas indeseables. Debido a que el nivel de ploidía de muchas cepas industriales dificulta en la mayor parte de los casos el bloqueo de la expresión mediante disrupción génica directa, es necesaria la utilización de sistemas de inactivación de expresión independientes del nivel de ploidía. El desarrollo de construcciones antisentido ex-20 presadas bajo el control de promotores fuertes posibilita la interrupción de la expresión génica. Este tipo de construcciones es especialmente útil en cepas industriales debido a que sus niveles de ploidía (Künkel et al. (1992) Appl. 25 Microbiol. Biotech. 36, 499-502) dificultan la obtención de inactivaciones génicas completas. La utilización de construcciones antisentido para el bloqueo de actividades enzimáticas ha sido descrita en levaduras (Atkins, D. et al. (1994). Biol. Chem. H-S 375, 721-729) y plantas (Hamada, T. 30 (1996). Transgenic Research 5, 115-121; John, M.E. (1996) Plant Mol. Biol. 30, 297-306). El promotor hex posee la

5

- 4 -

particularidad de codificar para una enzima extracelular, lo cual permite su utilización para la expresión de proteínas extracelulares.

Sin embargo, en el estado de la técnica no existen citas que describan ni las secuencias de los genes de los hongos filamentosos utilizados en la presente invención, ni de las enzimas sintetizadas por la expresión de los mismos. Tampoco se describe en dicho Estado de la Técnica la utilización de los promotores fuertes de los genes de los hongos descritos en la presente invención, para la expresión, secreción o inactivación de la expresión génica.

Descripción detallada de la invención

La utilización de promotores fuertes para superexpresar ciertos genes puede conducir a la mejora de la producción de penicilina o cefalosporina, así como a la síntesis de nuevos antibióticos derivados de estos últimos.

Esta invención describe un nuevo procedimiento para la obtención de cepas de *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* con capacidad de expresión de genes homólogos o heterólogos bajo el control de promotores fuertes. Se describe la caracterización y posterior utilización de los promotores correspondientes a los genes que codifican para glutamato deshidrogenasa NADP dependiente (EC.1.4.1.4)-gen *gdh*- de *P. chrysogenum*, β-N-acetilhexosaminidasa (EC.3.2.1.52)-gen hexde *P. chrysogenum* y γ-actina -gen *act*- de *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum*. La utilización de los citados promotores para superexpresar genes relacionados con la biosíntesis de penicilina y/o cefalosporina en las cepas anteriormente mencionadas es una de las finalidades de la presente invención.

5

10

20

25

Asimismo, estos promotores pueden utilizarse para el bloqueo de la expresión génica mediante construcciones antisentido.

La presente invención parte de P. chrysogenum y A. chrysogenum como donadores de los ácidos nucleicos. Una vez purificado el DNA genómico se construyeron sendas genotecas de ambos microorganismos tal y como se describe en los ejemplos 1 y 4, las cuales fueron rastreadas con: (I) oligonucleótidos sintéticos correspondientes al gen gdh de crassa para clonar el gen homólogo de P. chrysogenum, (II) combinaciones de oligonucleótidos sintetizados en base a la secuencia amino terminal de la enzima β -N-acetilhexosaminidasa para clonar el gen hex de P. chrysogenum y (III) fragmento del gen act de A. nidulans para clonar los genes homólogos de P. chrysogenum y A. chrysogenum. Los clones purificados en virtud de su capacidad para generar hibridación positiva con la sonda correspondiente fueron posteriormente analizados, determinándose la presencia de los genes buscados.

El gen gdh de P. chrysogenum se identificó en un frag-20 mento EcoRI de 7,2 kb y en dos fragmentos BamHI de 2,9 y 1,5 kb respectivamente. El mapa de restricción de la región de DNA que lo incluye aparece en la figura 1. Posteriormente se determinó la secuencia de 2.816 nucleótidos (SEQ ID NO:1), la cual incluye un marco abierto de lectura (ORF) con un pa-25 trón preferencial de utilización de codones muy marcado cuyo codón ATG de inicio de traducción se encontró en la posición 922 y su codón de terminación de la traducción TAA en la 2.522. Asimismo se determinó la presencia de 2 intrones de 159 pb y 56 pb entre las posiciones 971-1130 y 1262-1318 30 respectivamente. Dicho ORF codifica para una proteína de 49.837 Da y un punto isoeléctrico de 6.18 cuya secuencia de

10

- 6 -

461 aminoácidos (SEQ ID NO:5) posee un 72,4 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la enzima glutamato deshidrogenasa NADP dependiente de N. crassa. En la región promotora se encuentran zonas ricas en pirimidinas similares a las que aparecen en genes altamente expresados, así como dos 5 presuntas cajas TATA (esta caja se encuentra en ciertos promotores de hongos de 30 a 50 pb por encima del lugar de inicio de la transcripción) (Davis, M.A. and Hynes, M.J. (1991). More Gene Manipulations in Fungi, Academic Press, San Diego, California) y una caja CCAAT (la cual se encuen-10 tra en alrededor del 30% de promotores de genes eucariotas de 50 a 200 pb por encima del lugar de inicio de la transcripción) (Bucher, P. (1990) J. Mol. Biol. 212: 563-578). Seguidamente se utilizó este promotor para expresar en P. 15 chrysogenum y A. chrysogenum el gen que codifica para β galactosidasa (a partir de ahora denominado gen lacZ) de E. coli y el gen ble^R de S. hindustanus. Para ello se construyeron los plásmidos pSKGSu y pALfleo7 (figura 5) tal y como se describe en el ejemplo 1. De los resultados obtenidos se deduce que el promotor gdh (a partir de ahora denominado 20 Pgdh) es capaz de controlar la expresión tanto en P. chrysogenum y A. chrysogenum como en E. coli de los genes heteró $logos lacZ y ble^{R}$.

El desarrollo de construcciones antisentido expresadas

25 bajo el control de promotores fuertes posibilita la interrupción de la expresión génica. Con esta finalidad se construyó el plásmido pALP888 (figura 5) tal y como se describe
en el apartado 1.3 del ejemplo 1. Los resultados obtenidos
confirman la posibilidad de bloquear, total o parcialmente,

en P. chrysogenum actividades enzimáticas indeseables me-

- 7 -

diante la utilización de construcciones antisentido utilizando el Pgdh.

El gen hex de P. chrysogenum se identificó en fragmento SacI de 3,2 kb y en otro SalI de 2,1 kb. El mapa de restricción de la región de DNA que incluye el gen hex aparece en la figura 2. Seguidamente se determinó la secuencia de 5.240 nucleótidos (SEQ ID NO:2), confirmando la existencia de dos ORFs con un patrón preferencial de utilización de codones muy marcado, una de las cuales se correspondía con el gen hex. El codón ATG de inicio de traducción del gen hex se encontró en la posición 1.324 y el codón de terminación TGA en la 3.112. Dicho ORF carece de intrones y codifica para una proteína de 66.545 Da y un punto isoeléctrico de 5,34 cuya secuencia de 596 aminoácidos (SEQ ID NO:6) posee un 49,0 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la enzima β -N-acetilhexosaminidasa de Candida albicans. Asimismo, la secuencia de aminoácidos deducida incluye los polipéptidos determinados químicamente a partir de la enzima purificada en las posiciones 19-40 y 99-120. En la región promotora se encuentran dos zonas ricas en pirimidinas, una presunta caja TATA y la caja CAAT. Seguidamente se utilizó este promotor para expresar en P. chrysogenum el gen ble^R de S. hindustanus. Para ello se construyó el plásmido pALP480 (figura 6) tal y como se describe en el ejemplo 2. De los resultados obtenidos se deduce que el promotor hex (a partir de ahora denominado Phex) es capaz de controlar la expresión del gen heterólogo ble en P. chrysogenum. Asimismo, el hecho de que la enzima β -N-acetilhexosaminidasa sea una proteína abundantemente secretada por P. chrysogenum al medio de cultivo, posibilita la utilización del gen hex para expresión y secreción de proteínas homólogas o heterólogas

5

10

15

20

25

en *P. chrysogenum* u hongos filamentosos relacionados. Los genes a expresar pueden ser fusionados en marco de lectura con la región promotora, incluyendo la secuencia señal de secreción del gen *hex* o bien ser fusionados en marco de lectura con el gen *hex* completo.

El gen act de P. chrysogenum (a partir de ahora denominado actPc) se identificó en fragmentos BamHI de 5,2 kb, EcoRI de 4,9 kb y HindIII de 5,9 kb. El mapa de restricción de la región de DNA que incluye el gen actPc aparece en la figura 3. Una vez determinada la secuencia de 2.994 nucleó-10 tidos (SEQ ID NO:3), se confirmó la existencia de un ORF con un patrón preferencial de utilización de codones muy marcado. El codón ATG de inicio de traducción se encontró en la posición 494 y el codón de terminación TAA en la 2.250. Dicho ORF posee 5 intrones y codifica para una proteína de 15 41.760 Da y un punto isoeléctrico de 5,51 cuya secuencia de 375 aminoácidos (SEQ ID NO:7) posee un 98,1 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la proteína γ -actina de A. nidulans. En la región promotora se encuentran dos zonas 20 ricas en pirimidinas, una presunta caja TATA y cuatro cajas CAAT. Seguidamente se utilizó este promotor para expresar en P. chrysogenum el gen bl e^R de S. hindustanus. Para ello se construyó el plásmido pALPfleol (figura 6) tal y como se describe en el ejemplo 3. De los resultados obtenidos se deduce que el promotor act de P. chrysogenum (a partir de 25 ahora denominado PactPc) es capaz de controlar la expresión en P. chrysogenum del gen heterólogo ble?.

El gen act de A. chrysogenum (a partir de ahora denominado actAc) se identificó en fragmentos SalI de 2,4 y 1,1
30 kb, SmaI de 3,9 kb y HindIII de 8,7 kb. El mapa de restricción de la región de DNA que incluye el gen actAc apa-

- 9 -

rece en la figura 4. La secuencia de 3.240 nucleótidos determinada (SEQ ID NO:4) confirmó la existencia de un ORF con un patrón preferencial de utilización de codones muy marcado. El codón ATG de inicio de traducción se encontró en 5 la posición 787 y el codón de terminación TAA en la 2.478. Dicho ORF posee 5 intrones y codifica para una proteína de 41.612 Da y un punto isoeléctrico de 5,51 cuya secuencia de 375 aminoácidos (SEQ ID NO:8) posee un 98,4 % y un 98,1 % de identidad con las secuencias de aminoácidos correspondientes a las proteínas γ -actina de A. nidulans y P. chrysogenum 10 respectivamente. En la región promotora se encuentran zonas ricas en pirimidinas y una caja CAAT, no apreciándose la existencia de caja TATA. Seguidamente se utilizó este promotor para expresar en A. chrysogenum el gen ble^s de S. 15 hindustanus. Para ello se construyó el plásmido pALCfleol (figura 6) tal y como se describe en el ejemplo 4. De los resultados obtenidos se deduce que el promotor act de A. chrysogenum (a partir de ahora denominado PactAc) es capaz de controlar la expresión en A. chrysogenum del gen heteró-20 logo ble^R.

En todos los casos, la expresión en P. chrysogenum o A. chrysogenum del gen heterólogo bajo el control del promotor fúngico se realizó fusionando dicho gen en el marco de lectura correcto. A pesar de que a modo de ejemplo se han expresado los genes lacZ y ble^R, del mismo modo podrían expresarse genes que codifican para enzimas implicadas en la biosíntesis de penicilina: pcbAB (α-aminoadipil-cistenil-valina sintetasa), pcbC (isopenicilina N sintasa), penDE (acil-CoA:6-APA aciltransferasa), pcl (fenilacetil-CoA ligasa), etc. o cefalosporina: pcbAB (α-aminoadipil-cistenil-valina sintetasa), pcbC (isopenicilina N sintasa), cefD

25

- 10 -

(isopenicilina N isomerasa), cefEF (desacetoxicefalosporina C sintasa/hidroxilasa), cefG (desacetilcefalosporina C acetiltransferasa), etc. El gen a expresar puede haber sido obtenido por diferentes métodos: aislado a partir de DNA cromosómico, cDNA sintetizado a partir de mRNA, sintetizado químicamente, etc. Los procedimientos fundamentales para la correcta fusión promotor-gen están descritos en Sambrook, J. et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA y Ausubel et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA.

Como cepas hospedadoras se han utilizado P. chrysogenum y A. chrysogenum, no obstante, cualquier cepa relacionada o mutante derivado de ellas puede ser usada. El procedimiento empleado para la obtención de protoplastos y transformación de P. chrysogenum se basó en el descrito por Cantoral et al. en 1987 (Biotechnology 5: 494-497) y Díez et al. en 1987 (Curr. Genet. 12: 277-282) y se describe en el ejemplo 1. La obtención de protoplastos y transformación de A. chrysogenum se describe en el ejemplo 4. En ambos casos se utilizaron el antibiótico fleomicina como marcador de selección y los plásmidos pALfleo7, pALP480, pALPfleo1 o pALCfleo1, cuales son portadores del gen ble^R expresado bajo el control del Pgdh, Phex, PactPc y PactAc respectivamente. Sin embargo, podría utilizarse cualquier marcador que pueda separar selectivamente las cepas transformantes de aquellas otras que no lo son.

El transformante puede ser crecido en medios de cultivo que incluyan fuentes de carbono y nitrógeno capaces de ser asimiladas. Como ejemplos de fuentes de carbono pueden citarse glucosa, sacarosa, lactosa, almidón, glicerina, ácidos

5

10

15

20

25

- 11 -

orgánicos, alcoholes, ácidos grasos, etc., utilizadas solas o en combinación. Ejemplos de fuentes de nitrógeno serían peptona, extracto de malta, extracto de levadura, líquido de maceración de maíz, gluten, urea, sales de amonio, nitratos, NZ-amina, sulfato amónico, etc., utilizadas solas o en combinación. Como sales inorgánicas utilizables como componentes del medio de cultivo pueden citarse fosfatos (por ejemplo fosfato potásico), sulfatos (por ejemplo sulfato sódico), cloruros (por ejemplo cloruro magnésico), etc. y como iones hierro, magnesio, calcio, manganeso, cobalto, etc. Las condiciones de cultivo como temperatura de incubación, pH del medio de cultivo, aireación, tiempo de incubación, etc. deben ser seleccionadas y ajustadas de acuerdo con la cepa utilizada. No obstante, en términos generales, la fermentación se realiza durante un periodo de 4 a 14 días en condiciones aeróbicas a una temperatura entre 20°C y 30°C y un pH entre 5 y 9.

ិធ្យស្ថ

En resumen, la presente invención incluye : (I) fragmentos de DNA que contienen los promotores de los genes gdh, hex y act de P. chrysogenum y del gen act de A. chrysogenum, (II) plásmidos que incorporan los anteriormente citados promotores junto con su lugar de inicio de traducción, (III) plásmidos en los que un gen estructural homólogo o heterólogo o un fragmento de DNA antisentido es situado bajo el control de dichos promotores, (IV) cepas de P. chrysogenum o A. chrysogenum transformadas con dichos plásmidos, (VI) cepas transformantes capaces de expresar el gen estructural o el DNA antisentido situado en el plásmido bajo el control del promotor y (VII) cepas transformantes capaces de secretar proteínas extracelulares, homólogas o heterólogas, bajo el control del Phex.

5

10

15

20

25

- 12 -

Los siguientes ejemplos describen en detalle la presente invención sin limitar su alcance.

EJEMPLO 1

1.1. Clonación y caracterización del gen gdh de P. 5 chrysogenum.

Con la finalidad de clonar el gen gdh de P. chrysogenum, se construyó una genoteca en el vector fágico λGEM12 siguiendo procedimientos establecidos (Sambrook, J. et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA). Para 10 ello, el DNA total del hongo (purificado según el método Barredo et al. (1994) Patente española descrito por P9400931) fue parcialmente digerido con Sau3AI y los fragmentos de alrededor de 20 kb se purificaron en un gradiente de sacarosa (10-40%). Estos fragmentos se ligaron con los 15 brazos del vector previamente digeridos con BamHI y purificados y seguidamente la mezcla de ligación se encapsidó in vitro utilizando el sistema Gigapack II Gold (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Con la reac-20 ción de encapsidación resuspendida en 500 μl de SM se realizaron infecciones de E. coli LE392 para titular el número de fagos presentes y de E. coli NM539 con la finalidad de determinar el porcentaje de fagos recombinantes. E. coli NM539 es una cepa lisógena del fago P2 y sólo origina placas de lisis cuando el fago que la infecta carece de la región 25 central dispensable. El título fágico resultó ser de 132 ufp/ μ l (66.000 ufp totales) en *E. coli* LE392 y de 113 ufp/ μ l (56.500 ufp totales) en $E.\ coli$ NM539. Esto significaba que

- 13 -

alrededor del 85 % de los fagos eran portadores de un inserto de DNA exógeno. El cálculo del número de fagos recombinantes necesarios para constituir una genoteca completa se realizó con la ecuación: N= ln(1-p)/ln(1-f); donde "p" es la probabilidad deseada, "f" la proporción del genoma del organismo elegido contenida en un recombinante y "N" el número necesario de recombinantes. Asumiendo que el genoma de P. chrysogenum está contenido en alrededor de 30.000 kb (Fierro et al. (1993). Mol. Gen. Genet. 241: 573-578) y que el promedio de los insertos encapsidados fuera de 18 kb (a pesar de que se habían seleccionado tamaños alrededor de 20 kb), con el número de fagos recombinantes obtenidos se había obtenido una genoteca de P. chrysogenum con una probabilidad del 99.999 %. Una vez realizadas esta serie de comprobaciones teóricas, se infectó E. coli NM539 y la genoteca completa se extendió sobre 5 placas Petri de 150 mm de diámetro (alrededor de 11.300 ufp/placa Petri), se recogió en 50 ml de SM más 2.5 ml de cloroformo y se guardó a 4°C. De esta forma se disponía de un volumen suficientemente amplio y representativo de fagos recombinantes (5.300 $ufp/\mu l$) listos para ser plaqueados en cualquier momento.

Alrededor de 60.000 ufps fueron extendidas sobre 3 placas Petri de 150 mm de diámetro y seguidamente se transfirieron a filtros de nitrocelulosa (BA85, 0,45 µm, Schleicher & Schuell). Dichos filtros se hibridaron utilizando protocolos estándar (Sambrook, J. et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA) con oligonucleótidos sintéticos correspondientes al gen gdh de N. crassa. Un total de 10 clones positivos fueron purificados a través de un segundo y tercer ciclo de hibridación y seguidamente su DNA fue

10

15

20

25

- 14 -

digerido con una serie de endonucleasas de restricción y analizado por el método de Southern. De esta forma, se identificó el gen gdh en un fragmento EcoRI de 7,2 kb y en dos fragmentos BamHI de 2,9 y 1,5 kb respectivamente. Una vez realizadas las correspondientes subclonaciones en los plásmidos pBluescript I KS(+) (Stratagene) y pUC13, se construyeron los plásmidos pALP784 y pALP785, los cuales se corresponden con ambas orientaciones de un fragmento de 2,9 kb Sau3AI-XbaI que incluye el gen gdh. El mapa de restricción de la región de DNA que incluye dicho gen aparece en la figura 1.

Con la finalidad de determinar la secuencia de nucleótidos del gen gdh, se construyeron una serie de clones a partir de los plásmidos pALP784 y pALP785 por el método "Borrar una base -Erase a base-" (Promega) y posteriormente se secuenciaron por el método del didesoxinucleótido utilizando el dispositivo de ensayo -kit- "Sequenase" (USB) en ambos casos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuencia de 2.816 nucleótidos obtenida (SEQ ID NO:1) se analizó con el programa Geneplot (DNASTAR) confirmando la existencia de un ORF con un patrón preferencial de utilización de codones muy marcado. El codón ATG de inicio de traducción se encontró en la posición 922 y el codón de terminación TAA en la 2.522. Asimismo se determinó la presencia de 2 intrones de 159 pb y 56 pb entre las posiciones 971-1130 y 1262-1318 respectivamente. Dicho ORF codifica para una proteína de 49.837 Da y un punto isoeléctrico de 6.18 cuya secuencia de 461 aminoácidos (SEQ ID NO:5) posee un 72,4 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la enzima glutamato deshidrogenasa NADP dependiente N. crassa.

5

10

15

20

25

- 15 -

En la región promotora se encuentran varias zonas ricas en pirimidinas, si bien la localizada entre las posiciones 766-796 es la más extensa. Estas zonas aparecen en genes altamente expresados y se localizan inmediatamente por encima del lugar de inicio de la transcripción. Adicionalmente existen dos presuntas cajas TATA (cuya secuencia consenso en hongos es TATAAA) en las posiciones 752 (TATATAATT) y 852 (TATAATTT). Estas cajas TATA se encuentran en hongos de 30 a 50 pb por encima del lugar de inicio de la transcripción, 10 por lo que lo más probable es que la auténtica caja TATA sea la situada en la posición 752, es decir 42 pb por encima del lugar de inicio de la transcripción. La secuencia CCAAT se encuentra en la región promotora de alrededor del 30% de los genes eucariotas conocidos situada entre 50 y 200 pb por 15 encima del lugar de inicio de la transcripción. En la región promotora del gen gdh existe la caja CCAAT en la posición 691, es decir en torno a 105 pb por encima del presumible lugar de inicio de la transcripción.

1.2. Expresión de genes testigo en P. chrysogenum y A. 20 chrysogenum bajo el promotor gdh.

El proceso de transformación y selección de transformantes de *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* se realizó, tal y como se describe a continuación, en función de su resistencia al antibiótico fleomicina. Para ello fue preciso construir el plásmido pALfleo7, el cual posee un tamaño de 5.4 kb y es portador del gen ble⁸ de *S. hindustanus* expresado bajo el control del *Pgdh* como marcador en hongos, del gen de resistencia a cloranfenicol como marcador en *E. coli* y del polilinker del plásmido pBC KS (+) (Stratagene).

El procedimiento empleado para la obtención de protoplastos y transformación de P. chrysogenum fue el descrito por Cantoral et al. en 1987 (Biotechnology 5: 494-497) y Díez et al. en 1987 (Curr. Genet. 12: 277-282) con ligeras modificaciones. En primer lugar se creció P. chrysogenum en 5 el medio definido PM (Anné, J., (1997). Agricultura 25) con adición de extracto de levadura al 10% durante 18-21 horas a 25°C, se recuperó el micelio por filtración a través de un filtro de nylon y se lavó con 3-5 volúmenes de NaCl 0.9%. Tras secarlo entre papel de filtro, se resuspendió (100 10 mg/ml) en tampón de protoplastos. Cuando se consideró que la suspensión miceliar era homogénea, se le añadió un volumen de una solución de Caylasa (Cayla) 4 mg/ml en tampón de protoplastos y se incubó durante 3 horas a 25°C con agitación a 15 100 r.p.m. La aparición de protoplastos se siguió microscópicamente. En el momento en que la mayor parte de ellos se habían liberado, se separaron del micelio mediante filtración a través de un filtro de nylon de 30 μm de poro. La suspensión de protoplastos se lavó 3 veces con KCl 0.7 ${
m M}$ centrifugando a 400xg durante 3 minutos entre cada lavado. 20 Los protoplastos precipitados se resuspendieron en 10 ml de solución KCM y tras estimar su concentración mediante contaje en cámara Thoma, se ajustaron a 1-5 x 10^8 protoplastos/ml con KCM. Seguidamente, se mezclaron cuidadosamente 100 μ l de esta solución con 1-10 μ g de DNA más 10 μ l de PCM 25 y la mezcla se incubó en baño de agua-hielo durante 20 minutos. A continuación se añadieron 500 ml de PCM y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos tras los cuales se adicionaron 600 µl de KCM. La selección 30 de transformantes se realizó en base a la capacidad conferida por el gen de resistencia a flecmicina presente en los

- 17 -

plásmidos pALfleo7, pALP480 y pALPfleo1 para crecer en 30 μ g/ml de fleomicina. Para ello, se mezclaron 200 μ l de la reacción de transformación con 5 ml del medio Czapeck con adición de sorbitol (1 M) y fleomicina (30 μ g/ml), extendiéndose seguidamente sobre una placa Petri con 5 ml del mismo medio. Las placas se incubaron a 25°C hasta ver la aparición de transformantes (4-8 días).

El procedimiento empleado para la obtención de protoplastos y transformación de A. chrysogenum fue el descrito 10 por Gutiérrez et al. (1991). Mol. Gen. Genet. 225: 56-64. En primer lugar se creció la cepa de A. chrysogenum en el medio definido MMC durante 20-24 horas a 28°C, se recuperó el micelio por filtración a través de un filtro de nylon y se lavó con 3-5 volúmenes de NaCl 0.9%. Tras secarlo entre pa-15 pel de filtro, se resuspendió (50 mg/ml) en tampón de protoplastos. Cuando se consideró que la suspensión miceliar era homogénea, se le añadió DTT 10 mM final y se incubó a 28°C y 150 r.p.m. durante 1 hora. Seguidamente se centrifugó a 12.000xg durante 15 minutos y el precipitado se resuspendió 20 en 20 ml de tampón de protoplastos. Posteriormente se añadió un volumen de una solución de Caylasa (Cayla) 4 mg/ml en tampón de protoplastos y se incubó durante 3 horas a 25°C con agitación a 100 r.p.m. La aparición de protoplastos se siguió microscópicamente. En el momento en que la mayor par-25 te de ellos se habían liberado, se separaron del micelio mediante filtración a través de un filtro de nylon de 25 µm de poro. La suspensión de protoplastos se lavó 3 veces con KCl 0.7 M centrifugando a 1.000xg durante 3 minutos entre cada lavado. Los protoplastos precipitados se resuspendieron en 30 10 ml de tampón NCM y tras estimar su concentración mediante contaje en cámara Thoma, se ajustaron a 1-5 x 10° proto- 18 -

plastos/ml. Seguidamente, se mezclaron cuidadosamente 100 μl de esta solución con 1-10 µg de DNA y la mezcla se mantuvo en un baño de agua-hielo durante 20 minutos tras los cuales se adicionó 1 ml de CCM y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos más. La mezcla se centrifugó a 1.000xg durante 5 minutos y se resuspendió el sedimento en 800 μl de tampón NCM. La selección de transformantes se realizó en base a la capacidad conferida por el gen de resistencia a . fleomicina presente en los plásmidos pALfleo7 y pALCfleo1 para crecer en 10 $\mu g/ml$ de fleomicina. Para ello, se mezclaron 200 µl de la reacción de transformación con 5 ml del medio TSA con adición de sacarosa (0,3 M) y fleomicina (10 $\mu g/ml)$, extendiéndose seguidamente sobre una placa Petri con 5 ml del mismo medio. Las placas se incubaron a 28°C hasta ver la aparición de transformantes (5-8 días).

En los transformantes obtenidos se analizó (I) la presencia de DNA correspondiente al plásmido utilizado en la transformación, (II) la existencia de transcrito correspondiente al gen testigo y (III) la actividad enzimática 20 correspondiente al gen expresado. La obtención de DNA total se realizó de acuerdo con las condiciones descritas por Barredo et al. en 1994 (Patente española P9400931) y su posterior análisis se llevó a cabo por el método de Southern, según el procedimiento descrito por Sambrook et al. en 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA). La purificación de RNA total se realizó según el método el descrito por Ausubel et al. en 1987 (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA). El RNA obtenido se almacenó precipitado en etanol a -20°C. Para su utiliza-

5

10

15

25

- 19-

ción, se recuperó por centrifugación a 4°C y 10.000xg durante 20 minutos. La separación de las moléculas de RNA en base su tamaño molecular se realizó por electroforesis en agarosa-formaldehído. Seguidamente el RNA se transfirió a filtro de nitrocelulosa y se hibridó con la sonda deseada, todo ello según el método descrito por Sambrook et al. en 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA). La aparición de bandas de hibridación reveló la existencia de 10 transcritos y por tanto la capacidad de expresión de un gen bacteriano en el hongo hospedadora: P. chrysogenum o A. chrysogenum. La actividad enzimática β -galactosidasa se valoró en los transformantes de acuerdo con el método descrito por Sambrook et al. en 1989 (Molecular Cloning : A Labora-15 tory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA). La expresión del gen de resistencia a fleomicina se valoró en función del nivel de resistencia conferida a P. chrysogenum o A. chrysogenum en el medio sólido Czapeck tras su incubación a 25°C durante 7 días.

20 1.2.1. Expresión del gen lacZ de E. coli en P. chrysogenum y E. coli bajo el Pgdh.

El gen lacz de E. coli se fusionó traduccionalmente con el Pgdh con la finalidad de expresarlo en P. chrysogenum.

Para ello, entre los sitios EcoRI y SalI del plásmido pML1

(Carramolino et al. 1989. Gene 77: 31-38) se subclonó el gen lacz, generando el plásmido pMLac. Seguidamente, el Pgdh se introdujo entre los sitios EcoRI y SmaI de pMLac originando el plásmido pSKG (figura 5). Por último, el gen de resistencia a sulfonamida (Carramolino et al. 1989. Gene 77: 31-

- 20 -

38) se introdujo en el sitio EcoRI de pSKG dando lugar al plásmido pSKGSu (figura 5). En los transformantes de P. chrysogenum con el plásmido pSKGSu seleccionados por su resistencia a sulfonamida se analizó la presencia del plásmido por Southern y la existencia de transcrito correspondiente al gen lacZ por Northern. Posteriormente se midió la actividad enzimática β -galactosidasa en aquellos transformantes positivos en los dos análisis anteriores. Los transformantes expresaron eficientemente el gen lacZ de E. coli, observándose que los niveles de actividad β -galactosidasa en aquellos que contenían una copia del plásmido integrada en su genoma eran superiores a los encontrados en transformantes monocopia que expresaban el gen lacZ bajo el control del promotor de gen triptófano C (trpC).

El plásmido pSKG se introdujo en *E. coli* DH5α (Δ*lacZ*) con la finalidad de comprobar si el Pgdh de *P. chrysogenum* era también capaz de dirigir la expresión del gen *lacZ* en *E. coli*. Los transformantes obtenidos poseían la capacidad de generar colonias de color azul tras 10 días de incubación a 25°C en medio LB al que se había adicionado isopropil-β-D-galactósido (IPTG) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-gal). Este resultado confirmó que la construcción *Pgdh-lacZ* expresa la actividad enzimática β-galactosidasa en *E. coli*, si bien con menor eficiencia que el gen endógeno *lacZ* de *E. coli*.

1.2.2. Expresión del gen ble $^{\mathbb{R}}$ de S. hindustanus en P. chrysogenum bajo el Pgdh.

El gen ble^{2} carente de su región promotora se obtuvo a partir del plásmido pUT737 (Mullaney et al. (1985). Mol.

- 21 -

Gen. Genet. 199: 37-45) como un fragmento NcoI-ApaI de 1.100 pb. Seguidamente este fragmento se subclonó en el plásmido pUT713 previamente digerido NcoI-ApaI obteniéndose el plásmido pALfleo5. El Pgdh se recuperó a partir de pALP25 como un fragmento EcoRI-BamHI de 726 pb, el cual fue seguidamente 5 subclonado en pALfleo5 (previamente digerido EcoRI-BamHI) para generar pALfleo6. Este último plásmido posee un tamaño de 4,2 kb, el gen ble^{R} expresado bajo el control del Pgdh y el gen de resistencia a ampicilina como marcador en E. coli. Con la finalidad de sustituir este último marcador por el 10 gen de resistencia a cloranfenicol, a partir de pALfleo6 se purificó un fragmento de 1.900 pb EcoRI-NotI que incluía el Pgdh, ble y el terminador del gen trpC (TtrpC) y se ligó al plásmido pBC KS (+) (Stratagene) digerido EcoRI-NotI. Como resultado se obtuvo el plásmido pALfleo7 (figura 5), el cual 15 posee un tamaño de 5,4 kb y es portador del gen ble^{8} de S. hindustanus bajo el Pgdh como marcador de selección en hongos, del gen de resistencia a cloranfenicol como marcador en $E.\ coli$ y del polilinker del plásmido pBC KS (+). La se-20 cuenciación de la región de fusión entre Pgdh y ble confirmó la disposición de este último gen en el marco de lectura correcto.

Con el plásmido pALfleo7 se realizaron transformaciones de P. chrysogenum y A. chrysogenum, seleccionándose los transformantes en función de su capacidad de resistencia a 30 μ g/ml y 10 μ g/ml de fleomicina respectivamente. Seguidamente se estableció el máximo nivel de resistencia a fleomicina de los transformantes en medio sólido, obteniéndose algunos capaces de crecer en presencia de más de 100 μ g/ml de fleomicina. En los transformantes seleccionados por su resistencia a fleomicina se analizó por Southern la presencia

30

_ 22 _

del plásmido y por Northern la existencia de transcrito correspondiente al gen ble², obteniéndose resultados positivos en ambos casos. Estos resultados confirmaron la posibilidad de expresar genes heterólogos en P. chrysogenum y A. chrysogenum bajo el control del Pgdh.

El plásmido pALfleo7 se introdujo en E. coli con la finalidad de comprobar si el Pgdh de P. chrysogenum era también capaz de dirigir la expresión del gen ble en E. coli. Los transformantes obtenidos poseían la capacidad de crecer en LB con 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de fleomicina, siendo menor de 0,025 $\mu g/ml$ la concentración mínima inhibitoria de la fleomicina para E. coli. Este resultado confirmaba que el Pgdh se expresaba en E. coli, si bien con menor eficiencia que en P. chrysogenum. Un transformante de E. coli DH5lpha con el plásmido pALfleo7 está depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT4849. La obtención de otros plásmidos como pALP784 y pALP785 a partir del plásmido depositado simplemente consiste en seleccionar por hibridación con el promotor del gen gdh incluido en pALfleo7, el fragmento de 2,9 kb Sau3AI-XbaI y subclonarlo en pBluescript I KS(+) o pUC13, respectivamente.

1.3. Expresión antisentido en P. chrysogenum y A. chrysogenum bajo el promotor gdh.

La inactivación de la expresión génica en cepas in25 dustriales es en ocasiones necesaria para la eliminación de
actividades enzimáticas indeseables. Debido a que el nivel
de ploidía de muchas cepas industriales dificulta en la mayor parte de los casos el bloqueo de la expresión mediante
disrupción génica directa, es necesaria la utilización de

10

15

- 23 -

sistemas de inactivación de expresión independientes del nivel de ploidía. El desarrollo de construcciones antisentido expresadas bajo el control de promotores fuertes posibilita la interrupción de la expresión génica.

A modo de ejemplo, a continuación se describe la utili-5 zación del Pgdh para la inactivación de la expresión del gen que codifica para fenilacetato 2-hidroxilasa (pahA) en P. chrysogenum. En primer lugar se construyó el plásmido pALP873, el cual es portador del Pgdh y del TtrpC fusionados mediante un sitio único BamHI. El plásmido pALP873 se digi-10 rió BamHI, se rellenaron sus extremos con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I y se ligó con un fragmento de cDNA 1.053 pb interno al gen pahA obtenido a partir del plásmido pALP555 mediante digestión EcoRV. El plásmido resultante, denominado pALP874, se seleccionó por ser portador 15 del fragmento del gen pahA antisentido respecto del Pgdh. A partir de este plásmido se purificó un fragmento EcoRI-XbaI de 2,5 kb portador del cassette antisentido, el cual se rellenó con Klenow y se subclonó en el sitio EcoRV del plásmido pALfleo7 originando el plásmido pALP888. Este último 20 plásmido se caracteriza por poseer un tamaño de 7,9 kb y ser portador de (I) el cassette antisentido del gen pahA bajo el control del Pgdh, (II) el gen ble^R como marcador de selección en horgos, (III) el gen de resistencia a cloranfenicol como marcador en $E.\ coli$ y (IV) el polilinker del plásmido pBC KS 25 (+).

Con el plásmido pALP888 se realizaron transformaciones de *P. chrysogenum*, seleccionándose los transformantes en función de su resistencia a 30 µg/ml de fleomicina. Entre los transformantes seleccionados, alrededor del 20 % mostraban una capacidad de oxidación de ácido fenilacético reduci-

- 24 -

da, careciendo algunos de ellos de niveles detectables de dicha actividad. En estos transformantes se analizó por Southern la presencia del plásmido y por Northern, utilizando como sonda un oligonucleótido correspondiente a la cadena codificante, la existencia de transcrito antisentido correspondiente al gen pahA. En ambos casos se obtuvieron resultados positivos, confirmando la posibilidad de bloquear, total o parcialmente, en P. chrysogenum actividades enzimáticas indeseables mediante la utilización de construcciones antisentido. Estos resultados son extrapolables a hongos filamentosos relacionados y a cualquier actividad enzimática, utilizando alguno de los promotores descritos en la presente patente (Pgdh, Phex, PactPc y PactAc) o cualquier otro disponible.

15 EJEMPLO 2

2.1. Clonación y caracterización del gen hex de P. chrysogenum.

En el micelio de *P. chrysogenum* procedente de fermentaciones industriales en condiciones de producción de penicilina G, se determinó la presencia de una proteína mayoritaria que una vez purificada y caracterizada resultó ser la enzima β-N-acetilhexosaminidasa. La secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína purificada se determinó por el método de degradación de Edman, obteniéndose dos secuencias diferentes:

(A) Ala-Pro-Ser-Gly-Ile-His-Asn-Val-Asp-Val-(His)-Val-Val- (Asp)-Asn-(Asp)-Ala-(Asp)-Leu-Gln-Tyr-(Gly)

- 25 -

(B) Val-Gln-Val-Asn-Pro-Leu-Pro-Ala-Pro-(Arg) - (Arg) - Ile-(Thr) -???-(Gly) - (Ser) - (Ser) - (Gly) - (Pro) - (Ile/Thr) -???-(Val)

En función de estas secuencias y asumiendo la tendencia de utilización de codones existente en una serie de genes de *P. chrysogenum*, se diseñaron las siguientes combinaciones de oligonucleótidos sintéticos:

- (I) 5 TCGACGACGTGSACGTCSACGTTGTGGATGCC 3
- (II) 5° CCGTAYTGSAGGTCRGCGTCGTTGTCGACGAC 3°
- 10 (III) 5 GGGGCVGGSAGVGGGTTGACYTG 3

El gen hex de P. chrysogenum se clonó utilizando la genoteca y los procedimientos descritos en el ejemplo 1. Un total de 11 clones positivos fueron purificados y seguidamente su DNA fue digerido con una serie de endonucleasas de restricción y analizado por el método de Southern. De esta forma, se identificó el gen hex en un fragmento SacI de 3,2 kb y en otro SalI de 2,1 kb. La subclonación en ambas orientaciones del fragmento SalI en el plásmido pBC KS(+) (Stratagene) generó los plásmidos pALP295 y pALP303. El mapa de restricción de la región de DNA que incluye el gen hex aparece en la figura 2.

Con la finalidad de determinar la secuencia de nucleótidos del gen hex se utilizaron los plásmidos pALP295 y

25 pALP303 anteriormente citados, así como pALP319 y pALP461
(ambas orientaciones de un fragmento BamHI de 2,8 kb),
pALP388 y pALP389 (ambas orientaciones de un fragmento SalI
de 2,4kb) y pALP377 y pALP378 (ambas orientaciones de un
fragmento PstI de 1,2 kb) (figura 2). A partir de dichos
30 plásmidos se construyeron una serie de clones por el método

5

15

"Borrar una base -Erase a base-" (Promega) y posteriormente se secuenciaron por el método del didesoxinucleótido utilizando el dispositivo de ensayo -kit- "Sequenase" (USB) en ambos casos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuencia de 5.240 nucleótidos obtenida (SEQ ID NO:2) se analizó con el programa Geneplot (DNASTAR) confirmando la existencia de dos ORFs con un patrón preferencial de utilización de codones muy marcado. El codón ATG de inicio de traducción del gen hex se encontró en la posición 1.324 y el 10 codón de terminación TGA en la 3.112. Dicho ORF carece de intrones y codifica para una proteína de 66.545 Da y un punto isoeléctrico de 5,34 cuya secuencia de 596 aminoácidos (SEQ ID NO:6) posee un 49,0 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la enzima β -N-acetilhexosaminidasa de Can-15 dida albicans. Asimismo, la secuencia de aminoácidos deducida incluye, en las posiciones 19-40 y 99-120, las secuencias de aminoácidos determinadas químicamente a partir de la enzima purificada. Un lugar de reconocimiento de proteasa (Lys-Arg) aparece en las posiciones inmediatamente adya-20 centes a la secuencia de aminoácidos (A) anteriormente descrita (aminoácidos 97-98).

En la región promotora se encuentran dos zonas ricas en pirimidinas entre las posiciones 1.106-1.128 y 1.182-1.200, una presunta caja TATA en la posición 1.258 (ATAAATA) y una caja CAAT en la posición 1.163.

2.2. Expresión del gen ble^R de S. hindustanus en P. chrysogenum bajo el Phex.

Los procesos de: (I) transformación y selección de transformantes de P. chrysogenum, (II) análisis de DNA,

_ 27 _

(III) análisis de RNA y (IV) mediciones enzimáticas se realizaron tal y como se describe en el apartado 1.2 del ejemplo 1.

Para expresar el gen ble^R bajo el Phex, en primer lugar se construyó un sitio NcoI sobre el codón ATG que codifica para la metionina iniciadora del gen hex. Esto se realizó mediante PCR utilizando como "primers" los siguientes oligonucleótidos:

- 5 CTCCATGGTGATAAGGTGACGATG 3
- 5 GTAAAACGACGGCCAGTG 3 (Primer -20)

El fragmento de DNA obtenido por PCR se subclonó en ambas orientaciones en el sitio SmaI del plásmido pBC KS(+) (Stratagene) dando lugar a pALP427 y pALP428. Los insertos de ambos plásmidos fueron secuenciados utilizando los "dispositivo de ensayo -kit-s" "Borrar una base -Erase a base-" (Promega) y "Sequenase" (USB) en ambos casos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De esta forma se comprobó que el Phex obtenido carecía de mutaciones e incluía el sitio NcoI sobre el ATG que codifica para la metionina iniciadora de la proteína.

pALP427 fue el plásmido elegido para realizar la subclonación del gen ble. El gen ble carente de su región promotora se obtuvo a partir del plásmido pUT737 (Mullaney et al. (1985). Mol. Gen. Genet. 199: 37-45) como un fragmento NCOI-ApaI de 1.100 pb. Seguidamente este fragmento se subclonó en el plásmido pALP427 (portador del Phex) previamente digerido NCOI-ApaI obteniéndose el plásmido pALP480 (figura 6). Este último plásmido posee un tamaño de 5,4 kb, el gen ble expresado bajo el control del Phex, el terminador del gen trpC bajo el gen ble, el gen de resistencia a clo-

30

5

15

20

_ 28 _

ranfenicol como marcador en $E.\ coli$ y el polilinker del plásmido pBC KS (+). La secuenciación de la región de fusión entre Phex y ble^{g} confirmó la disposición de este último gen en el marco de lectura correcto.

5 Con el plásmido pALP480 se realizaron transformaciones de P. chrysogenum, seleccionándose los transformantes en función de su capacidad de resistencia a 30 $\mu g/ml$ de fleomicina. Seguidamente se estableció el máximo nivel de resistencia a fleomicina de los transformantes en medio sólido, 10 obteniéndose algunos capaces de crecer en presencia de más de 100 $\mu g/ml$ de fleomicina. En los transformantes seleccionados por su resistencia a fleomicina se analizó la presencia del plásmido por Southern y la existencia de transcrito correspondiente al gen ble^R por Northern, obteniéndose resul-15 tados positivos en ambos casos. Estos resultados confirmaron la posibilidad de expresar genes heterólogos en P. chrysogenum bajo el control del Phex. Un transformante de E. coli DH5α con el plásmido pALP480 está depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso 20 CECT4852. La obtención de los plásmidos pALP295, pALP319, pALP377 y pALP388 a partir del plásmido depositado simplemente consiste en seleccionar por hibridación, con el promotor del gen hex incluido en pALP480, los siguientes fragmentos de ADN: 2,1 kd SalI, 2,8 kb BamHI, 1,2 kb PstI y 2,4 kb 25 SalI, respectivamente y, a continuación, subclonarlos en pBluescript I KS(+).

2.3. Producción extracelular de proteínas en P. chrysogenum utilizando el gen hex.

La enzima β -N-acetilhexosaminidasa es una proteína abundantemente secretada por P. chrysogenum al medio de cultivo en fermentadores industriales en condiciones de producción de penicilina G. La capacidad de esta enzima para ser secretada posibilita la utilización del gen hex para la expresión y secreción de proteínas homólogas o heterólogas en P. chrysogenum u hongos filamentosos relacionados.

La enzima posee una secuencia señal de secreción compuesta por los siguientes aminoácidos: Met-Lys-Phe-Ala-Ser-10 Val-Leu-Asn-Val-Leu-Gly-Ala-Leu-Thr-Ala-Ala-Ser-Ala (aminoácidos l a 18 de SEQ ID NO: 6). En general, los péptidos señal poseen tres dominios estructurales conservados (Takizawa, N. et al. (1994) Recombinant microbes for industrial and agricultural applications. Murooka, Y. And Imanaka, T. (eds). Marcel Dekker, Inc. New York): (I) una región amino 15 terminal cargada positivamente denominada "n", la cual generalmente posee de 1 a 5 residuos y se requiere para la traslocación eficiente de la proteína a través de la membrana (Met-Lys), (II) una región hidrofóbica denominada 20 "h", compuesta por 7 a 15 residuos (Phe-Ala-Ser-Val-Leu-Asn-Val-Leu) y (III) una región polar en el extremo carboxilo denominada "c", compuesta por 3 a 7 residuos (Gly-Ala-Leu-Thr-Ala-Ala-Ser-Ala). La preproteína sintetizada intracelularmente se procesa por un sitio de corte compuesto por dos residuos básicos (Lys-Arg, aminoácidos 97 y 98 de 25 SEQ ID NO: 6) generando una proteína madura.

Existen dos posibilidades a la hora de expresar y secretar proteínas utilizando el gen hex: (I) fusionar en marco de lectura la región promotora, incluyendo la secuencia señal de secreción, a la región codificante del gen a expresar y (II) fusionar en marco de lectura el gen hex completo

30

~ 30 -

a la región codificante del gen a expresar. Utilizando técnicas estándar de biología molecular (Sambrook, J. et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA; Ausubel et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA), cualquier experto en el arte podría utilizar el promotor, incluyendo la secuencia de secreción del gen hex, o bien el gen completo, para la expresión y secreción de proteínas de interés en P. chrysogenum u hongos filamentosos relacionados.

EJEMPLO 3

10

3.1. Clonación y caracterización del gen act de P. chrysogenum.

El gen act de P. chrysogenum se clonó utilizando la genoteca y los procedimientos descritos en el ejemplo 1. En 15 este caso la hibridación se realizó con un fragmento NcoI-ClaI de 888 pb procedente del gen act de A. nidulans (Fidel et al. (1988). Gene 70: 283-293). Un total de 10 clones positivos fueron purificados y seguidamente su DNA fue digerido con una serie de endonucleasas de restricción y analizado 20 por el método de Southern. De esta forma, se identificó el gen act en fragmentos BamHI de 5,2 kb, EcoRI de 4,9 kb YHindIII de 5,9 kb. El fragmento HindIII fue subclonado en ambas orientaciones en el plásmido pBluescript I KS(+) (Stratagene) generando los plásmidos pALP298 y pALP299. La 25 subclonación en ambas orientaciones del fragmento EcoRI en el plásmido pBluescript I KS(+) (Stratagene) generó los plásmidos pALP315 y pALP316. El mapa de restricción de la región de DNA que incluye el gen act aparece en la figura 3.

- 31 -

Con la finalidad de determinar la secuencia de nucleótidos del gen act se utilizaron los plásmidos pALP315 y pALP316 anteriormente citados. A partir de dichos plásmidos. se construyeron una serie de clones por el método "Borrar una base -Erase a base-" (Promega) y posteriormente se se-5 cuenciaron por el método del didesoxinucleótido utilizando el dispositivo de ensayo -kit- "Sequenase" (USB) en ambos casos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuencia de 2.994 nucleótidos obtenida (SEQ ID NO:3) 10 analizó con el programa Geneplot (DNASTAR) confirmando la existencia de un ORF con un patrón preferencial de utilización de codones muy marcado. El codón ATG de inicio de traducción del gen act se encontró en la posición 494 y el codón de terminación TAA en la 2.250. Dicho ORF posee 5 intrones en las posiciones 501-616, 649-845, 905-1046, 1078-15 1180 y 1953-2021 y codifica para una proteína de 41.760 Da y un punto isoeléctrico de 5.51 cuya secuencia de 375 aminoácidos (SEQ ID NO:7) posee un 98,1 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la proteína γ-actina de A. 20 nidulans. En la región promotora se encuentran dos extensas zonas ricas en pirimidinas entre las posiciones 356-404 y 418-469, una presunta caja TATA en la posición 259 (TATAAAAAT) y cuatro cajas CAAT en las posiciones 174, 217, 230 y 337.

25 3.2. Expresión del gen ble en P. chrysogenum bajo el PactPc.

Para expresar el gen ble^R bajo el PactPc, en primer lugar se construyó un sitio NcoI sobre el codón ATG que codifica para la metionina iniciadora del gen hex. Esto se

- 32 -

realizó mediante PCR utilizando como "primers" los siguientes oligonucleótidos:

- 5 CTCCATGGTGACTGATTAAACAAGGGAC 3 C
- 5 GTAAAACGACGGCCAGTG 3 (Primer -20)

El fragmento de DNA obtenido por PCR se subclonó en ambas orientaciones en el sitio SmaI del plásmido pBC KS(+) (Stratagene) dando lugar a pALPact1 y pALPact2. Los insertos de ambos plásmidos fueron secuenciados utilizando los "dispositivo de ensayo -kit-s" "Borrar una base -Erase a base-" (Promega) y "Sequenase" (USB) en ambos casos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De esta forma se comprobó que el PactPc obtenido carecía de mutaciones e incluía el sitio NcoI sobre el ATG que codifica para la metionina iniciadora de la proteína.

15 pALPactl fue el plásmido elegido para realizar subclonación del gen ble El gen ble carente de su región promotora se obtuvo a partir del plásmido pUT737 (Mullaney et al. (1985). Mol. Gen. Genet. 199: 37-45) como un fragmento NcoI-ApaI de 1.100 pb. Seguidamente este fragmento se 20 subclonó en el plásmido pALPactl (portador del PactPc) previamente digerido NccI-ApaI obteniéndose el plásmido pALPfleol (figura 6). Este último plásmido posee el gen ble^{R} expresado bajo el control del PactPc, el terminador del gen trpC bajo el gen ble^R , el gen de resistencia a cloranfenicol como marcador en E. coli y el polilinker del plásmido pBC KS 25 (+). La secuenciación de la región de fusión entre PactPc y ble^{R} confirmó la disposición de este último gen en el marco de lectura correcto.

Con el plásmido pALPfleol se realizaron transformacio-30 nes de *P. chrysogenum*, seleccionándose los transformantes en

- 33 -

función de su capacidad de resistencia a 30 $\mu g/ml$ de fleomicina. Seguidamente se estableció el máximo nivel de resistencia a fleomicina de los transformantes en medio sólido, obteniéndose algunos capaces de crecer en presencia de más de 100 $\mu g/ml$ de fleomicina. En los transformantes seleccionados por su resistencia a fleomicina se analizó la presencia del plásmido por Southern y la existencia de transcrito correspondiente al gen ble^{g} por Northern, obteniéndose resultados positivos en ambos casos. Estos resultados confirmaron la posibilidad de expresar genes heterólogos en P. chrysogenum bajo el control del PactPc. Un transformante de E. coli DH5 α con el plásmido pALP315, el cual es portador del gen act, está depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT4851. La obtención del plásmido pALP316 a partir del plásmido depositado pALP315 simplemente consiste en subclonar el inserto pALP315 en el lugar EcoRI de pBluescript I KS(+) en la orientación opuesta.

EJEMPLO 4

5

10

15

20 4.1. Clonación y caracterización del gen act de A. chrysogenum.

Con la finalidad de clonar el gen gdh de A. chrysogenum, se construyó una genoteca en el vector fágico (GEM12 tal y como se describe en el apartado 1.1 del ejemplo1. El título fágico obtenido fue de 50 ufp/µl (25.000 ufp totales) en E. coli LE392 y de 41 ufp/µl (20.500 ufp totales) en E. coli NM539. Esto significaba que alrededor del 82 % de los

fagos eran portadores de un fragmento de DNA exógeno y que se había obtenido una genoteca A. chrysogenum con una probabilidad del 99.999 %. Una vez realizadas esta serie de comprobaciones teóricas, se infectó E. coli NM539 y la genoteca completa se extendió sobre 3 placas Petri de 150 mm de diámetro (alrededor de 7.000 ufp/placa Petri), se recogió en 50 ml de SM más 2.5 ml de cloroformo y se guardó a 4°C. De esta forma se disponía de un volumen suficientemente amplio y representativo de fagos recombinantes (2.100 ufp/ μ l) listos para ser plaqueados en cualquier momento.

Alrededor de 20.000 ufps fueron extendidas sobre 2 placas Petri de 150 mm de diámetro y seguidamente se transfirieron a filtros de nitrocelulosa (BA85, 0,45 μm, Schleicher & Schuell). Dichos filtros se hibridaron utilizando protocolos estándar (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA) con un fragmento NcoI-ClaI de 888 pb correspondiente al gen act de A. nidulans. Un total de 5 clones positivos fueron purificados y seguidamente su DNA fue digerido con una serie de endonucleasas de restricción y analizado por el método de Southern. De esta forma, se identificó el gen act en un fragmento HindIII de 8,7 kb. Este fragmento fue subclonado ambas orientaciones en en el plásmido pBluescript I KS(+) (Stratagene) generando los plásmidos pALC52 y pALC53. El mapa de restricción de la región de DNA que incluye el gen act aparece en la figura 4.

Con la finalidad de determinar la secuencia de nucleótidos del gen act se utilizaron los plásmidos pALC52 y pALC53 anteriormente citados. A partir de dichos plásmidos se construyeron una serie de clones por el método "Borrar una base -Erase a base-" (Promega) y posteriormente se se-

30

5

10

15

20

- 35 -

cuenciaron por el método del didesoxinucleótido utilizando el dispositivo de ensayo -kit- "Sequenase" (USB) en ambos casos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuencia de 3.240 nucleótidos obtenida (SEQ ID NO:4) analizó con el programa Geneplot (DNASTAR) confirmando la 5 existencia de un ORF con un patrón preferencial de utilización de codones muy marcado. El codón ATG de inicio de traducción del gen act se encontró en la posición 787 y el codón de terminación TAA en la 2.478. Dicho ORF posee 5 in-10 trones en las posiciones 794-920, 952-1.123, 1.180-1.289, 1.321-1.410 y 2.183-2.249 y codifica para una proteína de 41.612 Da y un punto isoeléctrico de 5.51 cuya secuencia de 375 aminoácidos (SEQ ID NO:8) posee un 98,4 % y un 98,1 % de identidad con las secuencias de aminoácidos de las proteínas γ -actina de A. nidulans y P. chrysogenum respectivamente. En 15 la región promotora se encuentra una zona rica en pirimidinas entre las posiciones 607-654, una presunta caja TATA en la posición 747 (TTATAAAA) y una caja CAAT en la posición 338.

20 4.2. Expresión del gen ble en A. chrysogenum bajo el PactAc.

Con la finalidad de expresar el gen ble bajo el control del PactAc, se construyó el plásmido pALCfleol (figura 6), el cual incluye el gen ble expresado bajo el control del PactAc, el terminador del gen trpC bajo el gen ble, el gen de resistencia a cloranfenicol como marcador en E. coli y el polilinker del plásmido pBC KS (+).

El gen ble^R carente de su región promotora se obtuvo a partir del plásmido pUT737 (Mullaney et al. (1985). Mol. Gen. Genet. 199: 37-45) como un fragmento NcoI-ApaI de 1.100

WO 98/39459 PCT/ES98/00056

_ 36 _

pb. Seguidamente este fragmento se fusionó en marco de lectura con el PactAc aprovechando que el gen act posee un sitio NcoI sobre el ATG que codifica para la metionina iniciadora de la proteína. Para ello, el gen ble se subclonó en el plásmido pALCactl (portador del PactAc) previamente digerido NcoI-ApaI obteniéndose el plásmido pALCfleol (figura 6). La secuenciación de la región de fusión entre PactAc y ble confirmó la disposición de este último gen en el marco de lectura correcto.

10 Con el plásmido pALCfleol se realizaron transformaciones de A. chrysogenum, seleccionándose los transformantes en función de su capacidad de resistencia a 10 μg/ml fleomicina. Seguidamente se estableció el máximo nivel de resistencia a fleomicina de los transformantes en medio só-15 lido, obteniéndose algunos capaces de crecer en presencia de más de 30 $\mu g/ml$ de fleomicina. En los transformantes seleccionados por su resistencia a fleomicina se analizó presencia del plásmido por Southern y la existencia de transcrito correspondiente al gen ble^R por Northern, obte-20 niéndose resultados positivos en ambos casos. Estos resultados confirmaron la posibilidad de expresar genes heterólogos en A. chrysogenum bajo el control del PactAc. Un transformante de $E.~coli~{ t DH5}\alpha~con~{ t el}~{ t plásmido}~{ t pALC52},~{ t el}$ cual es portador del gen act, está depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de ac-25 ceso CECT4850. La obtención del plásmido pALC53 a partir del plásmido depositado pALC52 simplemente consiste nar el inserto pALC52 en el lugar HindIII de pBluescript I KS(+) en la orientación opuesta.

WO 98/39459 PCT/ES98/00056

- 37 -

La introducción en actinomicetos, Penicillium, Aspergillus, Acremonium o Saccharomyces de los insertos presentes en los plásmidos depositados utilizando de hospedador a E. Coli, es tan solo cuestión de rutina técnica y de la elección de los vectores más apropiados para la transformación de dichos géneros o familias.

DESCIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Mapa de restricción del gen gdh de P. chrysogenum, el cual codifica para la actividad enzimática glutamato deshidrogenasa NADP dependiente (EC.1.4.1.4).

Figura 2.- Mapa de restricción del gen hex de P. chrysogenum, el cual codifica para la actividad enzimática β -N-acetilhexosaminidasa (EC.3.2.1.52).

Figura 3.- Mapa de restricción del gen act de P.
15 chrysogenum, el cual codifica para γ-actina.

Figura 4.- Mapa de restricción del gen act de A. chrysogenum, el cual codifica para γ -actina.

Figura 5.- Vectores para la expresión del gen lacZ de E. coli, del gen ble^R de S. hindustanus y del fragmento antisentido del gen pahA de P. chrysogenum en P. chrysogenum y/o A. chrysogenum bajo el promotor Pgdh.

Figura 6.- Vectores para la expresión del gen ble^R de S. hindustanus en P. chrysogenum y/o A. chrysogenum bajo los promotores Phex, PactPc, PactAc.

5

- 38 -

LISTADO DE SECUENCIAS

INFORMACION GENERAL:

SOLICITANTE:

NOMBRE: ANTIBIOTICOS, S.A.U.

CALLE: Avda. de Burgos, 8-A

CIUDAD: Madrid

ESTADO O PROVINCIA: Madrid

PAIS: España

CODIGO POSTAL: 28036

TELEFONO: 91-3841200

FACSIMIL: 91-3841220

TITULO: "PROMOTORES DE LOS GENES GLUTAMATO DESHIDROGENASA,

 β -N-ACETILHEXOSAMINIDASA Y γ -ACTINA Y SU UTILI-

ZACION EN SISTEMAS DE EXPRESION, SECRECION Y

ANTISENTIDO DE HONGOS FILAMENTOSOS".

NUMERO DE SECUENCIAS: 8

DIRECCION PARA CORRESPONDENCIA:

DESTINATARIO: ANTIBIOTICOS, S.A.U.

CALLE: Avda. de Burgos, 8-A

CIUDAD: Madrid

ESTADO O PROVINCIA: Madrid

PAIS: España

CODIGO POSTAL: 28036

FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

TIPO DE MEDIO: DISCO 3.5"

ORDENADOR: PC

SISTEMA OPERATIVO: WINDOWS

SOPORTE LOGICO: WORD

- 39 -

INFORMACION SOBRE EL ABOGADO/AGENTE:

NOMBRE: ALBERTO DE ELZABURU

NUMERO DE REGISTRO: 232/1

DIRECCION: Miguel Angel, 21

28010 - Madrid

INFORMACION SOBRE TELECOMUNICACIONES:

TELEFONO: 3085900

FACSIMIL: 3193810

TELEX O CORREO ELECTRONICO: elzaburu@elzaburu.es

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO.: 1

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 2816 pares de bases

TIPO: nucléotidos

NÚMERO DE HEBRAS: 2

CONFIGURACIÓN: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

HIPOTETICA: NO

ANTI-SENTIDO: NO

FUENTE DE ORIGEN: Penicillium chrysogenum

FUENTE INMEDIATA: plásmidos pALP784 y pALP785

POSICION EN EL GENOMA: desconocida

CARACTERÍSTICA:

NOMBRE/CLAVE: secuencia codificante

SITUACIÓN: unión (922...970, 1131...1261, 1319...2521

CARACTERISTICA:

NOMBRE CLAVE: intrón

SITUACION: 971...1130

CARACTERÍSTICA:

NOMBRE/CLAVE: intrón

SITUACION: 1262...1318

CARACTERÍSTICA:

OTRAS INFORMACIONES: gen gdh

- 40 -

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1

GATCGCCGTT TATGGGATAG TGGGCACGTG ACAGAGCCTG CAGCCGAGTC AAATTGCCGA AGTTGGCAGT TGGTGGCGGA GAACTCGAGA TTTTATTTGC GTTTATTTCG TTTATTTCGA	
	60
TEMPLORED CONTROL OF THE THE CONTROL OF THE CONT	120
TTTTAGTTTT CCTATTTTTC CTATTTTGGT TGATTCCATC CAACTTTATA GGATACTACT	180
TCATAATAGG TCGATCATAG TACAAGCACC AACTCGTCGC ATCATGCATT TTCTGGGGTT	240
CGAATTCTTT ACTTAGAGTA AGGTTTCTCT CAGCCTCCTA ATAAACTACC TAGGTAGGTT	300
AAATTTACTT TTTAACATTT TATTTATTCA GAAGATTGTC GGAGAGGACC GATCCGAAGG	360
ACACGAATTG AACACGGAAG GGATATTAGG GACAAGGAAG ATTTAGGGAT AAAAAAACGA	420
GCTGTGATTG ATGGGAAGGT TAAAGTGTAG TAATGAAGGT GATGGGACCA AAAGGAGTGG	480
GAGAGATAAG CCAAATTCTG TGCAAATTCT GTGACCTTAA ACCATAAGAT AACATTGTTC	540
GGGCCCCGAA CTTCGGACGT TCTTCCCACG GAAAGGCAAA TCATTGGGTT TCATCGATTC	600
TCTTGGATCT TTATCCTAAT TCCCCGTGCA ACCTGGTCTT GGGGATTATT GTCGACTTGT	660
AGGCGCATTA ACCCATCTCC CGTCTTCCCT CCAATCAATC CCGGATTCTC TCGTCCGACT	720
CCGGCTTCGA CTCTCTCT CTCCACATCT CTATATAATT GTACACTCCC CCATCCCATT	780
CTTTTCTTCT CTTCTCATCT ACTCTCTTGA ATCTCAATTG TCTTAATACT CTCTCTGCTC	840
TTGTCTTTAT TTATAATTTA TTAGATCACT GCTTAGCATT GATCTACTTA CCTAAAAGCA	900
GAGTTAACAG TACCGGCCGA A ATG ATG CAA AAC CTT CCC TTC GAG CCT GAG	
Met Met Gln Asn Leu Pro Phe Glu Pro Glu	951
10	
TTC GAG CAG GCC TAC AAG G GTATGTCTCT TTTAATTTTT CCCTTTCTTA TTTCAA	1006
Phe Glu Gln Ala Tyr Lys	
15	
TTCCATATCG TCCATATCAC ACACTATTTC CCGACTCAAT TCCTTTACCC ATCGGCATCT	1066
TCCCGGCCTT TGGCTCCACC GGGGGCATAA TTTCGGGGTG ACTCAGCTAA CAATCCCGAA	1126
ACAG AG CTC GCC TCC ACT CTC GAG AAC TCC ACT CTT TTC CAG AAG AAG	1174
Glu Leu Ala Ser Thr Leu Glu Asn Ser Thr Leu Phe Gln Lys Lys	
20 25	
CCC GAG TAC CGC AAG GCT CTT CAG GTC GTC TCT GTC CCC GAG CGT GTT	1222
Pro Glu Tyr Arg Lys Ala Leu Gln Val Val Ser Val Pro Glu Arg Val	
35 40 45	
ATT CAG TTC CGT GTT GTC TGG GAA GAT GAC AAA GGC CAG GTAAGACCTT	1271
Ile Gln Phe Arg Val Val Trp Glu Asp Asp Lys Gly Gln	14/1
The diff rie and var ind did ASD ASD LVS GIV GIN	12/1
	12/1
50 55 60	
50 55 60 TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC	1327
50 55 60 TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC Val Gln Ile	1327
50 55 60 TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC Val Gln Ile AAC CGT GGA TAC CGT GTC CAG TTC AAC TCC GCT CTT GGC CCC TAC AAG	
50 55 60 TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC Val Gln Ile AAC CGT GGA TAC CGT GTC CAG TTC AAC TCC GCT CTT GGC CCC TAC AAG Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys	1327
TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC Val Gln Ile AAC CGT GGA TAC CGT GTC CAG TTC AAC TCC GCT CTT GGC CCC TAC AAG Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys 65 70 75	1327 1375
TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC Val Gln Ile AAC CGT GGA TAC CGT GTC CAG TTC AAC TCC GCT CTT GGC CCC TAC AAG Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys 65 70 75 GGT GGC CTC CGG TTC CAC CCC ACG GTG AAC CTT TCC ATC CTC AAG TTC	1327
TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC Val Gln Ile AAC CGT GGA TAC CGT GTC CAG TTC AAC TCC GCT CTT GGC CCC TAC AAG Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys 65 70 75 GGT GGC CTC CGG TTC CAC CCC ACG GTG AAC CTT TCC ATC CTC AAG TTC Gly Gly Leu Arg Phe His Pro Thr Val Asn Leu Ser Ile Leu Lys Phe	1327 1375
TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC Val Gln Ile AAC CGT GGA TAC CGT GTC CAG TTC AAC TCC GCT CTT GGC CCC TAC AAG Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys 65 70 75 GGT GGC CTC CGG TTC CAC CCC ACG GTG AAC CTT TCC ATC CTC AAG TTC Gly Gly Leu Arg Phe His Pro Thr Val Asn Leu Ser Ile Leu Lys Phe 80 85 90 95	1327 1375 1423
TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC Val Gln Ile AAC CGT GGA TAC CGT GTC CAG TTC AAC TCC GCT CTT GGC CCC TAC AAG Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys 65 70 75 GGT GGC CTC CGG TTC CAC CCC ACG GTG AAC CTT TCC ATC CTC AAG TTC Gly Gly Leu Arg Phe His Pro Thr Val Asn Leu Ser Ile Leu Lys Phe 80 85 90 95 CTC GGT TTC GAG CAG ATC TTC AAG AAT GCC CTC ACC GGC CTG AAC ATG	1327 1375
TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC Val Gln Ile AAC CGT GGA TAC CGT GTC CAG TTC AAC TCC GCT CTT GGC CCC TAC AAG Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys 65 70 75 GGT GGC CTC CGG TTC CAC CCC ACG GTG AAC CTT TCC ATC CTC AAG TTC Gly Gly Leu Arg Phe His Pro Thr Val Asn Leu Ser Ile Leu Lys Phe 80 85 90 95 CTC GGT TTC GAG CAG ATC TTC AAG AAT GCC CTC ACC GGC CTG AAC ATG Leu Gly Phe Glu Gln Ile Phe Lys Asn Ala Leu Thr Gly Leu Asn Met	1327 1375 1423
TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC Val Gln Ile AAC CGT GGA TAC CGT GTC CAG TTC AAC TCC GCT CTT GGC CCC TAC AAG Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys 65 70 75 GGT GGC CTC CGG TTC CAC CCC ACG GTG AAC CTT TCC ATC CTC AAG TTC Gly Gly Leu Arg Phe His Pro Thr Val Asn Leu Ser Ile Leu Lys Phe 80 85 90 95 CTC GGT TTC GAG CAG ATC TTC AAG AAT GCC CTC ACC GGC CTG AAC ATG Leu Gly Phe Glu Gln Ile Phe Lys Asn Ala Leu Thr Gly Leu Asn Met 100 105 110	1327 1375 1423
TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC Val Gln Ile AAC CGT GGA TAC CGT GTC CAG TTC AAC TCC GCT CTT GGC CCC TAC AAG Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys 65 70 75 GGT GGC CTC CGG TTC CAC CCC ACG GTG AAC CTT TCC ATC CTC AAG TTC Gly Gly Leu Arg Phe His Pro Thr Val Asn Leu Ser Ile Leu Lys Phe 80 85 90 95 CTC GGT TTC GAG CAG ATC TTC AAG AAT GCC CTC ACC GGC CTG AAC ATG Leu Gly Phe Glu Gln Ile Phe Lys Asn Ala Leu Thr Gly Leu Asn Met 100 105 110 GGC GGT GGT AAG GGT GAA CC GAT	1327 1375 1423
TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC	1327 1375 1423
TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC Val Gln Ile AAC CGT GGA TAC CGT GTC CAG TTC AAC TCC GCT CTT GGC CCC TAC AAG Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys 65 70 75 GGT GGC CTC CGG TTC CAC CCC ACG GTG AAC CTT TCC ATC CTC AAG TTC Gly Gly Leu Arg Phe His Pro Thr Val Asn Leu Ser Ile Leu Lys Phe 80 85 90 95 CTC GGT TTC GAG CAG ATC TTC AAG AAT GCC CTC ACC GGC CTG AAC ATG Leu Gly Phe Glu Gln Ile Phe Lys Asn Ala Leu Thr Gly Leu Asn Met 100 105 110 GGC GGT GGT GGT AAG GGT GGA TCC GAC TTC GAC CCC AAG GGC AAG ACC GAT Gly Gly Gly Lys Gly Gly Ser Asp Phe Asp Pro Lys Gly Lys Thr Asp 115 120 125	1327 1375 1423
TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC Val Gln Ile AAC CGT GGA TAC CGT GTC CAG TTC AAC TCC GCT CTT GGC CCC TAC AAG Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys 65 70 75 GGT GGC CTC CGG TTC CAC CCC ACG GTG AAC CTT TCC ATC CTC AAG TTC Gly Gly Leu Arg Phe His Pro Thr Val Asn Leu Ser Ile Leu Lys Phe 80 85 90 95 CTC GGT TTC GAG CAG ATC TTC AAG AAT GCC CTC ACC GGC CTG AAC ATG Leu Gly Phe Glu Gln Ile Phe Lys Asn Ala Leu Thr Gly Leu Asn Met 100 105 110 GGC GGT GGT AAG GGT GGA TCC GAC TTC GAC CCC AAG GGC AAG ACC GAT Gly Gly Gly Lys Gly Gly Ser Asp Phe Asp Pro Lys Gly Lys Thr Asp 115 120 125 AAC GAG ATC CGC CGC TTC TGT GTC TCC TTC ATG ACC GAG CTG TGC AAG	1327 1375 1423
TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC Val Gln Ile AAC CGT GGA TAC CGT GTC CAG TTC AAC TCC GCT CTT GGC CCC TAC AAG Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys 65 70 75 GGT GGC CTC CGG TTC CAC CCC ACG GTG AAC CTT TCC ATC CTC AAG TTC Gly Gly Leu Arg Phe His Pro Thr Val Asn Leu Ser Ile Leu Lys Phe 80 85 90 95 CTC GGT TTC GAG CAG ATC TTC AAG AAT GCC CTC ACC GGC CTG AAC ATG Leu Gly Phe Glu Gln Ile Phe Lys Asn Ala Leu Thr Gly Leu Asn Met 100 105 110 GGC GGT GGT GGT AAG GGT GGA TCC GAC TTC GAC CCC AAG GGC AAG ACC GAT Gly Gly Gly Lys Gly Gly Ser Asp Phe Asp Pro Lys Gly Lys Thr Asp 115 120 125	1327 1375 1423 1471 1519
TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC Val Gln Ile AAC CGT GGA TAC CGT GTC CAG TTC AAC TCC GCT CTT GGC CCC TAC AAG Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys 65	1327 1375 1423 1471 1519
TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC Val Gln Ile AAC CGT GGA TAC CGT GTC CAG TTC AAC TCC GCT CTT GGC CCC TAC AAG Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys 65	1327 1375 1423 1471 1519
TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC VA1 Gln Ile AAC CGT GGA TAC CGT GTC CAG TTC AAC TCC GCT CTT GGC CCC TAC AAG Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys 65	1327 1375 1423 1471 1519
TCTTTTTGAA AATGTCTAAT TAATTGCCAC ATGCTAATTC CGTTCAG GTC CAA ATC Val Gln Ile AAC CGT GGA TAC CGT GTC CAG TTC AAC TCC GCT CTT GGC CCC TAC AAG Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys 65	1327 1375 1423 1471 1519

	CGC	GAG	GTT	GGT	TTC	ATG	TTC	GGC	CAG	TAC	AAG	AAG	ATC	CGC	AAC	1663
Gly	Arg	Glu	Val	Gly	Phe	Met	Phe	Gly	Gln	Tyr	Lys	Lvs	Ile	Ara	Asn	
160				_	165			_		170	-	-			175	
CAG	TGG	GAG	GGT	GTC	CTC	ACC	GGT	AAG	GGT	GGC	AGC	TGG	GGT	GGT		1711
	Trp															4/11
	-			180			1	-1-	185	017		115	Gry	190	261	
CTC	ATC	CGC	CCC		GCC	ACC	CGC	TAC		GTC	CTC	TAC	TAC		CAC	1750
	Ile															1759
шец		arg	195	Giu	Ala	TILL	GIV	200	Gry	Val	val	TYT	-	vaı	GLU	
CAC	א ידיכיי	N TO		CAC	000	maa	000		770	án.	T		205			
	ATG															1807
нта	Met		GIN	HIS	Ата	Ser		GIY	Lys	Glu	Ser		Ala	Gly	Lys	
~~~	~=~	210					215					220				
	GTC															1855
Arg	Val	Ala	Ile	Ser	Gly		Gly	Asn	Val	Ala	Gln	Tyr	Ala	Ala	Leu	
	225					230					235					
	GTC															1903
Lys	Val	Ile	Glu	Leu	Gly	Gly	Ser	Val	Ile	Ser	Leu	Ser	Asp	Ser	Gln	
240					245					250					255	
GGT	GCT	CTC	GTC	CTG	AAC	GGC	GAG	GAG	GGC	TCC	TTC	ACC	GCT	GAG	GAG	1951
Gly	Ala	Leu	Val	Leu	Asn	Gly	Glu	Glu	Gly	Ser	Phe	Thr	Ala	Glu	Glu	
				260					265					270		
ATC	AAC	ACC	ATC	GCT	GAG	ATC	AAG	GTC	CAG	CGC	AAG	CAG	ATC	GCC	GAG	1999
	Asn															
			275				•	280		_	•		285			
CTC	GCT	ACC	CAG	GAC	GCC	ттс	AGC		AAG	ттс	AAG	TAC		CCC	GGT	2047
	Ala															2047
		290	0211				295		<i>D</i> ₁ <i>S</i>	- 110	<b>-</b> 175	300	110	110	Gry	ā.
GCC	CGC		TCC	NCC	אאכ	አጥር '		CCC	CCC	NTC.	CAT		CCT	CTC	CCC	2005
	Arg															2095
7114	305	FIO	ттр	TILL	ASII		Ala	GIY	Arg	TIE		val	Ala	ьeu	PIO	
TCC		N.C.C	CZC	770	~~~	310	TCC.	000	C 7 T	010	315	220	~~~	c <b>m.c</b>		
	GCC															2143
320	Ala	TIIL	GIII	ASII		vai	Ser	GIĀ	Asp		Ala	Lys	Ala	Leu		
	CCT		таа	770	325		~~~		222	330					335	
	GCT															2191
Ala	Ala	GIA	Cys		Pne	TIE	Ala	GLu		Ser	Asn	Met	Gly		Thr	
a. a		~~~		340					345					350		
	GAG															2239
Gin	Glu	Ala		Asp	Val	Phe	Glu		His	Arg	Asp	Ala	Asn	Pro	Gly	
			355					360					365			
	GCT		ATC					GGT					GCT			2287
	GCT Ala	Ala	ATC					GGT					GCT			2287
Ala	Ala	Ala 370	ATC Ile	Trp	Tyr	Ala	Pro 375	GGT Gly	Lys	Ala	Ala	Asn 380	GCT Ala	Gly	Gly	2287
Ala GTT	Ala	Ala 370 GTC	ATC Ile TCT	Trp GGT	Tyr CTC	Ala GAG	Pro 375 ATG	GGT Gly GCC	Lys CAG	Ala AAC	Ala TCT	Asn 380 GCC	GCT Ala CGT	Gly GTC	Gly AAC	2287
Ala GTT	Ala	Ala 370 GTC	ATC Ile TCT	Trp GGT	Tyr CTC	Ala GAG	Pro 375 ATG	GGT Gly GCC	Lys CAG	Ala AAC	Ala TCT	Asn 380 GCC	GCT Ala CGT	Gly GTC	Gly AAC	
Ala GTT Val	Ala GCC Ala 385	Ala 370 GTC Val	ATC Ile TCT Ser	Trp GGT Gly	Tyr CTC Leu	Ala GAG Glu 390	Pro 375 ATG Met	GGT Gly GCC Ala	Lys CAG Gln	Ala AAC Asn	Ala TCT Ser 395	Asn 380 GCC Ala	GCT Ala CGT Arg	Gly GTC Val	Gly AAC Asn	
Ala GTT Val TGG	GCC Ala 385 TCC	Ala 370 GTC Val	ATC Ile TCT Ser	Trp GGT Gly GAG	Tyr CTC Leu GTT	Ala GAG Glu 390 GAC	Pro 375 ATG Met	GGT Gly GCC Ala CGT	Lys CAG Gln CTT	Ala AAC Asn AAG	TCT Ser 395 AAG	Asn 380 GCC Ala ATT	GCT Ala CGT Arg	Gly GTC Val GAG	Gly AAC Asn GAC	
Ala GTT Val TGG	Ala GCC Ala 385	Ala 370 GTC Val	ATC Ile TCT Ser	Trp GGT Gly GAG	Tyr CTC Leu GTT	Ala GAG Glu 390 GAC	Pro 375 ATG Met	GGT Gly GCC Ala CGT	Lys CAG Gln CTT	Ala AAC Asn AAG	TCT Ser 395 AAG	Asn 380 GCC Ala ATT	GCT Ala CGT Arg	Gly GTC Val GAG	Gly AAC Asn GAC	2335
Ala GTT Val TGG Trp 400	GCC Ala 385 TCC Ser	Ala 370 GTC Val CGT Arg	ATC Ile TCT Ser GAG Glu	Trp GGT Gly GAG Glu	Tyr CTC Leu GTT Val 405	GAG Glu 390 GAC Asp	Pro 375 ATG Met TCC Ser	GGT Gly GCC Ala CGT Arg	Lys CAG Gln CTT Leu	Ala AAC Asn AAG Lys 410	TCT Ser 395 AAG Lys	Asn 380 GCC Ala ATT Ile	GCT Ala CGT Arg ATG Met	Gly GTC Val GAG Glu	Gly AAC Asn GAC Asp 415	2335
Ala GTT Val TGG Trp 400	GCC Ala 385 TCC Ser	Ala 370 GTC Val CGT Arg	ATC Ile TCT Ser GAG Glu	Trp GGT Gly GAG Glu	Tyr CTC Leu GTT Val 405	GAG Glu 390 GAC Asp	Pro 375 ATG Met TCC Ser	GGT Gly GCC Ala CGT Arg	Lys CAG Gln CTT Leu	Ala AAC Asn AAG Lys 410	TCT Ser 395 AAG Lys	Asn 380 GCC Ala ATT Ile	GCT Ala CGT Arg ATG Met	Gly GTC Val GAG Glu	Gly AAC Asn GAC Asp 415	2335
Ala GTT Val TGG Trp 400 TGC	GCC Ala 385 TCC Ser	Ala 370 GTC Val CGT Arg	ATC Ile TCT Ser GAG Glu AAC	GGT Gly GAG Glu GGT	Tyr CTC Leu GTT Val 405 CTC	GAG Glu 390 GAC Asp	Pro 375 ATG Met TCC Ser	GGT Gly GCC Ala CGT Arg	CAG Gln CTT Leu	Ala AAC Asn AAG Lys 410 GAG	TCT Ser 395 AAG Lys	Asn 380 GCC Ala ATT Ile GTC	GCT Ala CGT Arg ATG Met	Gly GTC Val GAG Glu CCT	Gly AAC Asn GAC Asp 415 GCT	2335
Ala GTT Val TGG Trp 400 TGC	GCC Ala 385 TCC Ser	Ala 370 GTC Val CGT Arg	ATC Ile TCT Ser GAG Glu AAC	GGT Gly GAG Glu GGT	Tyr CTC Leu GTT Val 405 CTC	GAG Glu 390 GAC Asp	Pro 375 ATG Met TCC Ser	GGT Gly GCC Ala CGT Arg	CAG Gln CTT Leu	Ala AAC Asn AAG Lys 410 GAG	TCT Ser 395 AAG Lys	Asn 380 GCC Ala ATT Ile GTC	GCT Ala CGT Arg ATG Met	Gly GTC Val GAG Glu CCT	Gly AAC Asn GAC Asp 415 GCT	2335
Ala GTT Val TGG Trp 400 TGC Cys	Ala GCC Ala 385 TCC Ser TTC	Ala 370 GTC Val CGT Arg AAC Asn	ATC Ile TCT Ser GAG Glu AAC Asn	GGT GAG Glu GGT Gly 420	Tyr CTC Leu GTT Val 405 CTC Leu	Ala GAG Glu 390 GAC Asp TCT Ser	Pro 375 ATG Met TCC Ser ACT Thr	GGT Gly GCC Ala CGT Arg GCT Ala	CAG Gln CTT Leu AAG Lys 425	Ala AAC Asn AAG Lys 410 GAG Glu	TCT Ser 395 AAG Lys TAT Tyr	Asn 380 GCC Ala ATT Ile GTC Val	GCT Ala CGT Arg ATG Met ACC Thr	Gly GTC Val GAG Glu CCT Pro 430	Gly AAC Asn GAC Asp 415 GCT Ala	2335 2383 2431
Ala GTT Val TGG Trp 400 TGC Cys	GCC Ala 385 TCC Ser TTC Phe GGT	Ala 370 GTC Val CGT Arg AAC Asn	TCT Ser GAG Glu AAC Asn	GGT Gly GAG Glu GGT Gly 420 CCT	Tyr CTC Leu GTT Val 405 CTC Leu TCC	GAG Glu 390 GAC Asp TCT Ser	Pro 375 ATG Met TCC Ser ACT Thr	GGT Gly GCC Ala CGT Arg GCT Ala	CAG Gln CTT Leu AAG Lys 425 GGC	Ala AAC Asn AAG Lys 410 GAG Glu TCC	TCT Ser 395 AAG Lys TAT Tyr	Asn 380 GCC Ala ATT Ile GTC Val	GCT Ala CGT Arg ATG Met ACC Thr	Gly GTC Val GAG Glu CCT Pro 430 GGT	Gly AAC Asn GAC Asp 415 GCT Ala	2335
Ala GTT Val TGG Trp 400 TGC Cys	Ala GCC Ala 385 TCC Ser TTC	Ala 370 GTC Val CGT Arg AAC Asn	TCT Ser GAG Glu AAC Asn	GGT Gly GAG Glu GGT Gly 420 CCT	Tyr CTC Leu GTT Val 405 CTC Leu TCC	GAG Glu 390 GAC Asp TCT Ser	Pro 375 ATG Met TCC Ser ACT Thr	GGT Gly GCC Ala CGT Arg GCT Ala	CAG Gln CTT Leu AAG Lys 425 GGC	Ala AAC Asn AAG Lys 410 GAG Glu TCC	TCT Ser 395 AAG Lys TAT Tyr	Asn 380 GCC Ala ATT Ile GTC Val	GCT Ala CGT Arg ATG Met ACC Thr	Gly GTC Val GAG Glu CCT Pro 430 GGT	Gly AAC Asn GAC Asp 415 GCT Ala	2335 2383 2431

WO 98/39459 PCT/ES98/00056

- 42 -

ACC AAG GTC GCT GAG GCC ATG AAG GAG CAC GGT GAC TGG TGG TAAATTAGTC 2531
Thr Lys Val Ala Glu Ala Met Lys Glu His Gly Asp Trp Trp

450

GCATCCCCAT TTATTCTGGG AGGTGTTCTG TGACGATTTC TGTCCTCTCT TAAGGAGAGG 2591
CAGCTTTGAT GCATTTCTT TTCATTTAAA TAGCTTTTTA CCCTTTTTGT CAAGCGGGTT 2651
ACGGATAGAG GCGCTTGGTT TCCTCCACTG TTGCATTCGA TTGATATCCC CACTTGAGCA 2711
CCGCTGTTTG TTTTGGTTCT GCACTTGGGA CTGTCATGAT GATAATGAGA TACAATGAAT 2771
AACTTAAAAA TAATTGTGTG GTCTCGTAAA GTTGTAAACT CTAGA 2816

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO.: 2

### CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 5240 pares de bases

TIPO: nucléotidos NÚMERO DE HEBRAS: 2 CONFIGURACIÓN: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

HIPOTETICA: NO ANTI-SENTIDO: NO

FUENTE DE ORIGEN: Penicillium chrysogenum

FUENTE INMEDIATA: plásmidos pALP295 y pALP388

POSICION EN EL GENOMA: desconocida

CARACTERÍSTICA:

NOMBRE/CLAVE: secuencia codificante

SITUACIÓN: 1324...3111

CARACTERISTICA:

OTRAS INFORMACIONES: gen hex

#### DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2

GTCGACCTCG	CAACAGTCGA	GAAGCACGCC	GCCTATCTCG	CCCGCAGCGG	GGTAACCGGC	60
				ACCGGGAAGA		120
				ACAGCAACAT		180
GCCGGCTGTG	GCGCCGCCTC	AACCCGTGAG	ACCATCCAAT	TCTGCCAGGA	CTCCGGTGCA	240
GCAGGCGCCG	ACGCTGTCCT	CGTGCTCCCA	CCCAGCTACT	ACAAGTCCCT	CGTGAGCACC	300
GAGTCCATGC	ACGCCCACTT	CCGGGCTGTG	GCCGATGCCT	CGCCCGTCCC	TGTCCTCATC	360
TACAACTTCC	CCGGCGTGCA	GTCCGGCCTC	GATCTCAGCT	CAGATGATAT	CTTAACTCTC	420
GCAGAACACC	CCAATATCAT	CGGCTGTAAG	CTCACGTGCG	GCAACACGGG	TAAGTTGGCT	480
CGTGTTGCGG	CGGCCAAGCC	GGATTTCTTG	ACTTTTGGTG	GCTCGGCCGA	TTTCACGCTG	540
CAGACGCTGG	TTGTTGGTGG	GGCGGGGATT	ATCGGTGGCG	TGGCTAACAT	GATTCCTCGC	600
TCGTGTGTGC	GTCTGATGGA	GTTGTATCGT	GCTGGGAAGG	TTCAGGAGGC	GCAGAAGGTG	660
CAGGCTATTG	TTGCGCGCGC	TGACTGGGCT	GCTATCCATG	GTGGCTTTAT	CGCTGTTAAG	720
ACGGGCCTCC	AAGCCTACCA	CGGTTACGGT	GGTCTTCCTC	GGCGGCCTTG	TGTCGTGCCT	780
TCTGCTAAGG	ATGCGGCAGC	CATTCAGGAG	GAGTTCCGGG	AGGGAATGGA	GCTGGAGAAG	840

GATCCGGAGA TCCCGTAGCT TTCCCCCTCT TTATCTTTTA ATATTTGTTG TTATATGGGA 1 GTTCAAGTTG CATGTAGAGG TTGCACTCTC TCTCTCTCT TTTCCCTTGA ATTATTTGAG 1											900 960 1020 1080 1140 1200						
	AGGG	TTGC	JAT (	CTG	GGCC2	AT TO		ATTC	C GA1	rgaa.	AGAT	CGA	CAAT	GCA	GCTA	AACATA	1260
	AAT	AGTTO	CTG (	GTTA:	rctc(	CT G	GCCA(	CAGT	r rc	rcta(	CTTT	TCA:	rcgr(	CAC	TCAC	CTTATC	1320
	AAC														ACG		1368
		1				5					10				Thr	15	
	GCG	TCC	GCC	GTC	CAA	GTG	AAT	CCA	CTT	CCC	GCC	CCC	CGT	AAC	ATC	ACC	1416
					20					25					Ile 30		
															AAC		1464
	Trp	Gly	Ser	Ser 35	Gly	Pro	Ile	Gln	Val 40	Asn	Asn	Leu	Asn	Leu 45	Asn	Gly	
	CCT	CAC	TCC	CCT	TTG	CTC	ACT	CAA	GCT	TGG	GAG	CGA	GCA	TGG	GAA	ACC	1512
	Pro	His	Ser	Pro	Leu	Leu	Thr	Gln	Ala	Trp	Glu	Arg	Ala	Trp	Glu	Thr	
			50					55					60				
	ATC	ACC	ACC	CTG	CAA	TGG	GTT	CCT	GCT	GCT	GTT	GAA	TCC	CCA	ATC	GCC	1560
		65			•		70					75			Ile		••
	TCC	TAT	CCG	GCC	TTC	CCC	ACC	TCG	ACC	CCT	GTC	TCC	TCT	GCC	CCC	AAG	1608
	80					85					90				Pro	95	
	GCC	AAA	CGC	GCG	CCC	TCC	GGA	ATC	CAT	AAC	GTC	GAT	GTT	CAT	GTG	GTG	1656
					100					105					Val 110		
															ACA		1704
				115					120					125	Thr		
	GTA	GTG	AGC	GAT	GGT	GGC	ATC	AGG	ATC	AAT	TCT	CAG	ACG	GTC	TGG	GGT	1752
			130					135					140		Trp	_	
	GTG	TTG	CAG	GCA	TTC	ACC	ACC	CTG	CAG	CAG	ATT	ATC	ATC	TCG	GAT	GGG	1800
		145					150					155			Asp	_	
	AAG	GGC	GGT	TTG	ATC	ATT	GAA	CAG	CCC	GTC	AAG	ATC	AAG	GAT	GCC	CCG	1848
	Lys	Gly	Gly	Leu	Ile		Glu	Gln	Pro	Val	Lys	Ile	Lys	Asp	Ala	Pro	
	160					165					170					175	
	CTG	TAC	CCC	CAT	CGT	GGT	ATC	ATG	ATA	GAC	ACC	GGG	CGC	AAC	TTC	ATT	1896
					180					185					Phe 190		
															TCC		1944
				195					200					205	Ser	-	
	CTC	AAT	GTT	CTC	CAC	TGG	CAC	TTG	GAC	GAT	TCT	CAG	TCG	TGG	CCC	ATG	1992
			210					215					220		Pro		
	CAG	ATG	AGC	TCC	TAC	CCG	GAG	ATG	ACC	AAA	GAT	GCT	TAC	TCG	CCT	CGC	2040
		225					230					235			Pro	-	
	GAA	ATC	TAC	ACC	GAG	CAC	GAC	ATG	CĢC	CGC	GTG	ATT	GCC	TAC	GCA	CGC	2088
	Glu 240	Ile	Tyr	Thr	Glu	His 245	Asp	Met	Arg	Arg	Val 250	Ile	Ala	Tyr	Ala	Arg 255	

GCG	CGA	GGT	GTC	CGC	GTC	ATC	CCC	GAG	GTC	GAC	ATG	CCC	GCC	CAC	TCA	2136
Ala	Arg	Gly	Val	Arg	Val	Ile	Pro	Glu	Val	Asp	Met	Pro	Ala	His	Ser	
				260					265	_				270		
GCC	TCC	GGC	TGG	CAG	CAG	GTC	GAC	CCG		ATC	GTG	GCA	TCT	GCC	CAA	2184
Ala	Ser	Glv	Trp	Gln	Gln	Val	Asp	Pro	Glu	Tle	Ual	713	Cvc	777	Clu	2104
		1	275					280	Olu	110	VAI	AIA		ALA	GIU	
TCC	TGG	TGG		AAC	GAC	CTT	TGG		CAC	CAC	N.C.C	ccc	285	C D C	222	2020
Ser	Trp	Tro	Ser	Δen	Agn	Val	Tres	λl -	CIL	CAC	Mb	37-	GIC	CAG	CCG	2232
		290	001	7311	rap	vai		АІА	GIU	HIS	inr		val	GIn	Pro	
AAC	ССТ		CAC	CTC	C 7 C	7 CD CD	295	m = 0				300				
Aen	CCT	Clar	CAG	CIC	DAC 3	All	AIC	TAC	-	AAG	ACC	TAC	GAA	GTT	GTC	2280
ASII	Pro 305	GTA	GIII	Leu	Asp		TTE	Tyr	Pro	Lys		Tyr	Glu	Val	Val	
7 7 C		CTC	ma a	a. a	~	310					315					
AAC	AAT	GIC	TAC	CAG	GAA	TTG	TCT	CGC	ATC	TTC	AGC	GAC	AAC	TTG	TTC	2328
ASII	Asn	vai	Tyr	Gin		Leu	Ser	Arg	Ile	Phe	Ser	Asp	Asn	Leu	Phe	
320	amm				325					330					335	
CAC	GTT	GGT	GCA	GAC	GAG	ATC	CAG	CCC	AAC	TGC	TAC	AAC	TAC	AGC	ACC '	2376
His	Val	Gly	Ala	Asp	Glu	Ile	Gln	Pro	Asn	Cys	Tyr	Asn	Tyr	Ser	Thr	
				340					345					350		
CAT	ATC	ACT	AAG	TGG	TTT	GCC	GAG	GAT	CCC	TCG	CGC	ACC	TAC	AAC	GAC	2424
His	Ile	Thr	Lys	Trp	Phe	Ala	Glu	Asp	Pro	Ser	Arg	Thr	Tyr	Asn	Asp	
			355					360					365		-	
CTT	GCG	CAG	TAC	TGG	GTT	GAC	CAT	TCC	ATG	CCC	ATC	TTC	CGT	AGT	GTC	2472
Leu	Ala	Gln	Tyr	Trp	Val	Asp	His	Ser	Met	Pro	Ile	Phe	Arg	Ser	Val	
		370					375					380				
GGC	GAC	CAC	CGC	CGT	CTT	ATG	ATG	TGG	GAG	GAC	ATA	GCT	ATC	GCG	ACT	2520
${ t Gly}$	Asp	His	Arg	Arg	Leu	Met	Met	Trp	Glu	Asp	Ile	Ala	Ile	Ala	Thr	
	385					390				_	395					
GAA	AGC	GCC	CAC	GAC	GTG	CCC	AAA	GAC	GTC	ATC	ATG	CAG	ACC	TGG	AAC	2568
Glu	Ser	Ala	His	Asp	Val	Pro	Lys	Asp	Val	Ile	Met	Gln	Thr	Trp	Asn	2300
Glu 400	Ser	Ala	His	Asp	Val 405	Pro	Lys	Asp	Val	Ile 410	Met	Gln	Thr	Trp	Asn 415	
Glu 400	Ser	Ala	His	Asp	Val 405	Pro	Lys	Asp	Val	Ile 410	Met	Gln	Thr	Trp	Asn 415	•
Glu 400 AGC	Ser	Ala	His	Asp GAG	Val 405 GGT	Pro AAC	Lys ATC	Asp AAG	Val AAA	Ile 410 CTC	Met ACC	Gln TCC	Thr	Trp GGC	Asn 415 TAC	2616
Glu 400 AGC	Ser	Ala	His	Asp GAG	Val 405 GGT	Pro AAC	Lys ATC	Asp AAG	Val AAA	Ile 410 CTC	Met ACC	Gln TCC	Thr	Trp GGC	Asn 415 TAC	•
Glu 400 AGC Ser	Ser GGC Gly	Ala GAG Glu	His GGT Gly	Asp GAG Glu 420	Val 405 GGT Gly	Pro AAC Asn	Lys ATC Ile	Asp AAG Lys	Val AAA Lys 425	Ile 410 CTC Leu	Met ACC Thr	Gln TCC Ser	Thr GCC Ala	Trp GGC Gly 430	Asn 415 TAC Tyr	2 <b>61</b> 6
Glu 400 AGC Ser GAC	Ser GGC Gly GTT	Ala GAG Glu GTC	His GGT Gly GTT	Asp GAG Glu 420 TCG	Val 405 GGT Gly	Pro AAC Asn TCC	Lys ATC Ile GAT	Asp AAG Lys TTC	Val AAA Lys 425 CTC	Ile 410 CTC Leu TAC	Met ACC Thr	Gln TCC Ser GAC	Thr GCC Ala TGC	Trp GGC Gly 430 GGG	Asn 415 TAC Tyr	•
Glu 400 AGC Ser GAC	Ser GGC Gly	Ala GAG Glu GTC	His GGT Gly GTT	Asp GAG Glu 420 TCG	Val 405 GGT Gly	Pro AAC Asn TCC	Lys ATC Ile GAT	Asp AAG Lys TTC	Val AAA Lys 425 CTC	Ile 410 CTC Leu TAC	Met ACC Thr	Gln TCC Ser GAC	Thr GCC Ala TGC	Trp GGC Gly 430 GGG	Asn 415 TAC Tyr	2 <b>61</b> 6
Glu 400 AGC Ser GAC Asp	GGC Gly GTT Val	Ala GAG Glu GTC Val	GGT Gly GTT Val 435	Asp GAG Glu 420 TCG Ser	Val 405 GGT Gly ACC Thr	Pro AAC Asn TCC Ser	Lys ATC Ile GAT Asp	ASP AAG Lys TTC Phe 440	Val AAA Lys 425 CTC Leu	Ile 410 CTC Leu TAC Tyr	Met ACC Thr CTC Leu	Gln TCC Ser GAC Asp	Thr GCC Ala TGC Cys 445	Trp GGC Gly 430 GGG Gly	Asn 415 TAC Tyr CGC Arg	2616 2664
Glu 400 AGC Ser GAC Asp	GGC Gly GTT Val	Ala GAG Glu GTC Val TAT	GGT Gly GTT Val 435 GTC	Asp GAG Glu 420 TCG Ser ACC	Val 405 GGT Gly ACC Thr	Pro AAC Asn TCC Ser GAC	ATC Ile GAT Asp	ASP  AAG Lys  TTC Phe 440 CGC	Val AAA Lys 425 CTC Leu TAC	Ile 410 CTC Leu TAC Tyr	Met ACC Thr CTC Leu GTG	Gln TCC Ser GAC Asp	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC	Trp GGC Gly 430 GGG Gly	Asn 415 TAC Tyr CGC Arg	2 <b>61</b> 6
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly	GGC Gly GTT Val GGC Gly	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450	GGT Gly GTT Val 435 GTC Val	Asp GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr	Val 405 GGT Gly ACC Thr AAC Asn	Pro AAC Asn TCC Ser GAC Asp	ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455	Asp AAG Lys TTC Phe 440 CGC Arg	Val AAA Lys 425 CTC Leu TAC Tyr	Ile 410 CTC Leu TAC Tyr AAC Asn	Met ACC Thr CTC Leu GTG Val	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC Ser	GGC Gly 430 GGG Gly AAC Asn	Asn 415 TAC Tyr CGC Arg ACC Thr	2616 2664
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly	GGC Gly GTT Val GGC Gly	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450	GGT Gly GTT Val 435 GTC Val	Asp GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr	Val 405 GGT Gly ACC Thr AAC Asn	AAC Asn TCC Ser GAC Asp	ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455	Asp AAG Lys TTC Phe 440 CGC Arg	Val AAA Lys 425 CTC Leu TAC Tyr	Ile 410 CTC Leu TAC Tyr AAC Asn	Met ACC Thr CTC Leu GTG Val	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC Ser	GGC Gly 430 GGG Gly AAC Asn	Asn 415 TAC Tyr CGC Arg ACC Thr	2616 2664 2712
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly	Ser GGC Gly GTT Val GGC Gly GGC	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450 GGA	His GGT Gly GTT Val 435 GTC Val	Asp GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr	Val 405 GGT Gl; ACC Thr AAC Asn	AAC Asn TCC Ser GAC Asp	ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455 TAC	Asp AAG Lys TTC Phe 440 CGC Arg	Val AAA Lys 425 CTC Leu TAC Tyr	Ile 410 CTC Leu TAC Tyr AAC Asn	ACC Thr CTC Leu GTG Val	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460 GGC	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC Ser	Trp  GGC Gly 430 GGG Gly  AAC Asn	Asn 415 TAC Tyr CGC Arg ACC Thr	2616 2664
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly	GGC Gly GTT Val GGC Gly	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450 GGA	His GGT Gly GTT Val 435 GTC Val	Asp GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr	Val 405 GGT Gl; ACC Thr AAC Asn	AAC Asn TCC Ser GAC Asp	ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455 TAC	Asp AAG Lys TTC Phe 440 CGC Arg	Val AAA Lys 425 CTC Leu TAC Tyr	Ile 410 CTC Leu TAC Tyr AAC Asn	ACC Thr CTC Leu GTG Val	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460 GGC	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC Ser	Trp  GGC Gly 430 GGG Gly  AAC Asn	Asn 415 TAC Tyr CGC Arg ACC Thr	2616 2664 2712
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly GAC Asp	GGC Gly GGC Gly 465	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450 GGA Gly	GGT Gly GTT Val 435 GTC Val GTG Val	Asp GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr AAC Asn	Val 405 GGT Gly ACC Thr AAC Asn TTC Phe	AAC Asn GAC Asp AAC Asn 470	ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455 TAC Tyr	Asp AAG Lys TTC Phe 440 CGC Arg GGC Gly	AAA Lys 425 CTC Leu TAC Tyr	Ile 410 CTC Leu TAC Tyr AAC Asn	Met ACC Thr CTC Leu GTG Val GGT Gly 475	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460 GGC Gly	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC Ser TCC	Trp  GGC Gly 430 GGG Gly  AAC Asn TGG Trp	Asn 415 TAC Tyr CGC Arg ACC Thr	2616 2664 2712 2760
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly GAC Asp	GGC Gly GGC Gly 465 CCC	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450 GGA Gly TAC	GGT Gly GTT Val 435 GTC Val GTG Val	GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr AAC ASN	Val 405 GGT Gly ACC Thr AAC Asn TTC Phe	AAC Asn GAC Asp AAC Asn 470 CAG	ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455 TAC Tyr CGC	Asp AAG Lys TTC Phe 440 CGC Arg GGC Gly	Val AAA Lys 425 CTC Leu TAC Tyr GGC Gly TAC	Ile 410 CTC Leu TAC Tyr AAC Asn GAC Asp	Met ACC Thr CTC Leu GTG Val GGT Gly 475 TAC	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460 GGC Gly	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC Ser TCC Ser	Trp  GGC Gly 430 GGG Gly  AAC Asn TGG Trp	Asn 415 TAC Tyr CGC Arg ACC Thr TGC Cys	2616 2664 2712
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly GAC Asp	GGC Gly GGC Gly 465	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450 GGA Gly TAC	GGT Gly GTT Val 435 GTC Val GTG Val	GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr AAC ASN	Val 405 GGT Gly ACC Thr AAC Asn TTC Phe	AAC Asn GAC Asp AAC Asn 470 CAG	ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455 TAC Tyr CGC	Asp AAG Lys TTC Phe 440 CGC Arg GGC Gly	Val AAA Lys 425 CTC Leu TAC Tyr GGC Gly TAC	Ile 410 CTC Leu TAC Tyr AAC Asn GAC Asp	Met ACC Thr CTC Leu GTG Val GGT Gly 475 TAC	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460 GGC Gly	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC Ser TCC Ser	Trp  GGC Gly 430 GGG Gly  AAC Asn TGG Trp	Asn 415 TAC Tyr CGC Arg ACC Thr TGC Cys ACG Thr	2616 2664 2712 2760
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly GAC Asp	GGC Gly GGC Gly 465 CCC Pro	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450 GGA Gly TAC Tyr	GGT Gly GTT Val 435 GTC Val GTG Val AAG Lys	Asp GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr AAC Asn ACC Thr	Val 405 GGT Gly ACC Thr AAC Asn TTC Phe TGG Trp 485	Pro AAC Asn TCC Ser GAC Asp AAC Asn 470 CAG Gln	Lys ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455 TAC Tyr CGC Arg	Asp AAG Lys TTC Phe 440 CGC Arg GGC Gly ATC Ile	Val AAA Lys 425 CTC Leu TAC Tyr GGC Gly TAC Tyr	Ile 410 CTC Leu TAC Tyr AAC Asn GAC Asp	Met ACC Thr CTC Leu GTG Val GGT Gly 475 TAC Tyr	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460 GGC Gly GAC Asp	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC Ser TCC Ser TTC Phe	Trp  GGC Gly 430 GGG Gly  AAC Asn  TGG Trp  CTC Leu	Asn 415 TAC Tyr  CGC Arg  ACC Thr  TGC Cys  ACG Thr  495	2616 2664 2712 2760 2808
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly GAC Asp GCC Ala 480 AAT	GGC Gly GGC Gly 465 CCC Pro	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450 GGA Gly TAC Tyr ACT	GGT Gly GTT Val 435 GTC Val GTG Val AAG Lys	Asp GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr AAC Asn ACC Thr	Val 405 GGT Gly ACC Thr AAC Asn TTC Phe TGG Trp 485 GAA	Pro AAC Asn TCC Ser GAC Asp AAC Asn 470 CAG Gln GCG	ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455 TAC Tyr CGC Arg	Asp AAG Lys TTC Phe 440 CGC Arg GGC Gly ATC Ile	Val AAA Lys 425 CTC Leu TAC Tyr GGC Gly TAC Tyr ATT	Ile 410 CTC Leu TAC Tyr AAC Asn GAC Asp 490 ATC	Met ACC Thr CTC Leu GTG Val GGT Gly 475 TAC Tyr	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460 GGC Gly GAC Asp	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC Ser TCC Ser TTC Phe	Trp  GGC Gly 430 GGG Gly  AAC Asn  TGG Trp  CTC Leu  GCT	Asn 415 TAC Tyr  CGC Arg  ACC Thr  TGC Cys  ACG Thr 495 CCT	2616 2664 2712 2760
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly GAC Asp GCC Ala 480 AAT	GGC Gly GGC Gly 465 CCC Pro	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450 GGA Gly TAC Tyr ACT	GGT Gly GTT Val 435 GTC Val GTG Val AAG Lys	Asp GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr AAC Asn ACC Thr	Val 405 GGT Gly ACC Thr AAC Asn TTC Phe TGG Trp 485 GAA	Pro AAC Asn TCC Ser GAC Asp AAC Asn 470 CAG Gln GCG	ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455 TAC Tyr CGC Arg	Asp AAG Lys TTC Phe 440 CGC Arg GGC Gly ATC Ile	AAA Lys 425 CTC Leu TAC Tyr GGC Gly TAC Tyr	Ile 410 CTC Leu TAC Tyr AAC Asn GAC Asp 490 ATC	Met ACC Thr CTC Leu GTG Val GGT Gly 475 TAC Tyr	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460 GGC Gly GAC Asp	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC Ser TCC Ser TTC Phe	GGC Gly 430 GGG Gly AAC Asn TGG Trp CTC Leu GCT Ala	Asn 415 TAC Tyr  CGC Arg  ACC Thr  TGC Cys  ACG Thr 495 CCT	2616 2664 2712 2760 2808
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly GAC Asp GCC Ala 480 AAT Asn	GGC Gly GGC Gly 465 CCC Pro	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450 GGA Gly TAC Tyr ACT Thr	GGT Gly GTT Val 435 GTC Val GTG Val AAG Lys TCC Ser	Asp GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr AAC Asn ACC Thr TCC Ser 500	Val 405 GGT Gly ACC Thr AAC Asn TTC Phe TGG Trp 485 GAA Glu	Pro AAC Asn TCC Ser GAC Asp AAC Asn 470 CAG Gln GCG Ala	ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455 TAC Tyr CGC Arg AAG Lys	Asp  AAG Lys  TTC Phe 440 CGC Arg  GGC Gly  ATC Ile  CAC His	Val AAA Lys 425 CTC Leu TAC Tyr GGC Gly TAC Tyr ATT Ile 505	Ile 410 CTC Leu TAC Tyr AAC Asn GAC Asp 490 ATC Ile	Met ACC Thr CTC Leu GTG Val GGT Gly 475 TAC Tyr GGC Gly	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460 GGC Gly GAC Asp GCC Ala	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC Ser TCC Ser TTC Phe GAG Glu	Trp  GGC Gly 430 GGG Gly  AAC Asn  TGG Trp  CTC Leu  GCT Ala 510	Asn 415 TAC Tyr  CGC Arg  ACC Thr  TGC Cys  ACG Thr 495 CCT Pro	2616 2664 2712 2760 2808
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly GAC Asp GCC Ala 480 AAT Asn	GGC Gly GGC Gly 465 CCC Pro CTC Leu TGG	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450 GGA Gly TAC Tyr ACT Thr	GGT Gly GTT Val 435 GTC Val GTG Val AAG Lys TCC Ser GAG	Asp GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr AAC Asn ACC Thr TCC Ser 500 CAG	Val 405 GGT Gly ACC Thr AAC Asn TTC Phe TGG Trp 485 GAA Glu	Pro AAC Asn TCC Ser GAC Asp AAC Asn 470 CAG Gln GCG Ala GAC	ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455 TAC Tyr CGC Arg AAG Lys	Asp AAG Lys TTC Phe 440 CGC Arg GGC Gly ATC Ile CAC His	Val  AAA Lys 425 CTC Leu  TAC Tyr  GGC Gly  TAC Tyr  ATT Ile 505 ACC	Ile 410 CTC Leu  TAC Tyr  AAC Asn  GAC Asp 490 ATC Ile GTC	Met ACC Thr CTC Leu GTG Val GGT Gly 475 TAC Tyr GGC Gly TCC	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460 GGC Gly GAC Asp GCC Ala AGC	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC Ser TCC Phe GAG Glu GTG	Trp  GGC Gly 430 GGG Gly  AAC Asn  TGG Trp  CTC Leu  GCT Ala 510 TTC	Asn 415 TAC Tyr  CGC Arg  ACC Thr  TGC Cys  ACG Thr 495 CCT Pro	2616 2664 2712 2760 2808
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly GAC Asp GCC Ala 480 AAT Asn	GGC Gly GGC Gly 465 CCC Pro	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450 GGA Gly TAC Tyr ACT Thr	GGT Gly GTT Val 435 GTC Val GTG Val AAG Lys TCC Ser GAG	Asp GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr AAC Asn ACC Thr TCC Ser 500 CAG	Val 405 GGT Gly ACC Thr AAC Asn TTC Phe TGG Trp 485 GAA Glu	Pro AAC Asn TCC Ser GAC Asp AAC Asn 470 CAG Gln GCG Ala GAC	ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455 TAC Tyr CGC Arg AAG Lys	Asp  AAG Lys  TTC Phe 440 CGC Arg  GGC Gly  ATC Ile  CAC His  GTG Val	Val  AAA Lys 425 CTC Leu  TAC Tyr  GGC Gly  TAC Tyr  ATT Ile 505 ACC	Ile 410 CTC Leu  TAC Tyr  AAC Asn  GAC Asp 490 ATC Ile GTC	Met ACC Thr CTC Leu GTG Val GGT Gly 475 TAC Tyr GGC Gly TCC	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460 GGC Gly GAC Asp GCC Ala AGC	Thr GCC Cys 445 AGC Ser TCC Ser TTC Phe GAG Glu GTG Val	Trp  GGC Gly 430 GGG Gly  AAC Asn  TGG Trp  CTC Leu  GCT Ala 510 TTC	Asn 415 TAC Tyr  CGC Arg  ACC Thr  TGC Cys  ACG Thr 495 CCT Pro	2616 2664 2712 2760 2808
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly GAC Asp TTG Leu	GGC Gly GGC Gly 465 CCC Pro CTC Leu TGG Trp	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450 GGA Gly TAC Tyr ACT Thr TCG Ser	GGT Gly GTT Val 435 GTC Val GTG Val AAG Lys TCC Ser GAG Glu 515	Asp GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr AAC Asn ACC Thr TCC Ser 500 CAG Gln	Val 405 GGT Gly ACC Thr AAC Asn TTC Phe TGG Trp 485 GAA Glu GTC Val	AAC Asn GAC Asn GCG Ala GAC Asp	ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455 TAC Tyr CGC Arg AAG Lys GAT Asp	Asp  AAG Lys  TTC Phe 440 CGC Arg  GGC Gly  ATC Ile  CAC His  GTG Val 520	AAA Lys 425 CTC Leu TAC Tyr GGC Gly TAC Tyr ATT Ile 505 ACC Thr	Ile 410 CTC Leu  TAC Tyr  AAC Asn  GAC Asp  GAC Asp 490 ATC Ile  GTC Val	Met ACC Thr CTC Leu GTG Val GGT Gly 475 TAC Tyr GGC Gly TCC Ser	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460 GGC Gly GAC Asp GCC Ala AGC Ser	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC Ser TCC Ser TTC Phe GAG Glu GTG Val 525	GGC Gly 430 GGG Gly AAC Asn TGG Trp CTC Leu GCT Ala 510 TTC Phe	Asn 415 TAC Tyr  CGC Arg  ACC Thr  TGC Cys  ACG Thr 495 CCT Pro  TGG Trp	2616 2664 2712 2760 2808 2856
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly GAC Asp TTG Leu CCT	GGC Gly GGC Gly 465 CCC Pro CTC Leu TGG Trp CGC	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450 GGA Gly TAC Tyr ACT Thr TCG Ser GCT	GGT Gly GTT Val 435 GTC Val GTG Val AAG Lys TCC Ser GAG Glu 515 GCT	Asp GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr AAC Asn ACC Thr TCC Ser 500 CAG Gln GCT	Val 405 GGT Gly ACC Thr AAC Asn TTC Phe TGG Trp 485 GAA Glu GTC Val	AAC Asp AAC Asp GCG Ala GAC Asp GGT	ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455 TAC Tyr CGC Arg AAG Lys GAT Asp	ASP  AAG Lys  TTC Phe 440 CGC Arg  GGC Gly  ATC Ile  CAC His  GTG Val 520 CTT	AAA Lys 425 CTC Leu TAC Tyr GGC Gly TAC Tyr ATT Ile 505 ACC Thr	Ile 410 CTC Leu  TAC Tyr  AAC Asn  GAC Asp 490 ATC Ile  GTC Val  TGG	Met ACC Thr CTC Leu GTG Val GGT Gly 475 TAC Tyr GGC Gly TCC Ser	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460 GGC Gly GAC Asp GCC Asp	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC Ser TCC Ser TTC Phe GAG Glu GTG Val 525 AAC	Trp  GGC Gly 430 GGG Gly  AAC Asn  TGG Trp  CTC Leu  GCT Ala 510 TTC Phe  CGT	Asn 415 TAC Tyr  CGC Arg  ACC Thr  TGC Cys  ACG Thr 495 CCT Pro  TGG Trp	2616 2664 2712 2760 2808
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly GAC Asp TTG Leu CCT	GGC Gly GGC Gly 465 CCC Pro CTC Leu TGG Trp	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450 GGA Gly TAC Tyr ACT Thr TCG Ser GCT	GGT Gly GTT Val 435 GTC Val GTG Val AAG Lys TCC Ser GAG Glu 515 GCT	Asp GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr AAC Asn ACC Thr TCC Ser 500 CAG Gln GCT	Val 405 GGT Gly ACC Thr AAC Asn TTC Phe TGG Trp 485 GAA Glu GTC Val	AAC Asp AAC Asp GCG Ala GAC Asp GGT	ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455 TAC Tyr CGC Arg AAG Lys GAT Asp	ASP  AAG Lys  TTC Phe 440 CGC Arg  GGC Gly  ATC Ile  CAC His  GTG Val 520 CTT	AAA Lys 425 CTC Leu TAC Tyr GGC Gly TAC Tyr ATT Ile 505 ACC Thr	Ile 410 CTC Leu  TAC Tyr  AAC Asn  GAC Asp 490 ATC Ile  GTC Val  TGG	Met ACC Thr CTC Leu GTG Val GGT Gly 475 TAC Tyr GGC Gly TCC Ser	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460 GGC Gly GAC Asp GCC Ala AGC Ser GGT Gly	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC Ser TCC Ser TTC Phe GAG Glu GTG Val 525 AAC	Trp  GGC Gly 430 GGG Gly  AAC Asn  TGG Trp  CTC Leu  GCT Ala 510 TTC Phe  CGT	Asn 415 TAC Tyr  CGC Arg  ACC Thr  TGC Cys  ACG Thr 495 CCT Pro  TGG Trp	2616 2664 2712 2760 2808 2856
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly GAC Asp GCC Ala 480 AAT Asn TTG Leu CCT Pro	GGC Gly GGC Gly 465 CCC Pro CTC Leu TGG Trp CGC Arg	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450 GGA Gly TAC Tyr ACT Thr TCG Ser GCT Ala 530	GGT Gly GTT Val 435 GTC Val GTG Val AAG Lys TCC Ser GAG Glu 515 GCT Ala	Asp GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr AAC Asn ACC Thr TCC Ser 500 CAG Gln GCT Ala	Val 405 GGT Gly ACC Thr AAC Asn TTC Phe TGG Trp 485 GAA Glu GTC Val CTG Leu	Pro AAC Asn TCC Ser GAC Asp AAC Asn 470 CAG Gln GCG Ala GAC Asp	ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455 TAC Tyr CGC Arg AAG Lys GAT Asp GAG Glu 535	Asp  AAG Lys  TTC Phe 440 CGC Arg  GGC Gly  ATC Ile  CAC His  GTG Val 520 CTT Leu	AAA Lys 425 CTC Leu TAC Tyr GGC Gly TAC Tyr ATT Ile 505 ACC Thr GTC Val	Ile 410 CTC Leu  TAC Tyr  AAC Asn  GAC Asp 490 ATC Ile GTC Val  TGG Trp	Met ACC Thr CTC Leu GTG Val GGT Gly 475 TAC Tyr GGC Gly TCC Ser TCT Ser	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460 GGC Gly GAC Asp GCC Ala AGC Ser GGT Gly 540	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC Ser TCC Ser TTC Phe GAG Glu GTG Val 525 AAC Asn	Trp  GGC Gly 430 GGG Gly  AAC Asn  TGG Trp  CTC Leu  GCT Ala 510 TTC Phe  CGT Arg	Asn 415 TAC Tyr  CGC Arg  ACC Thr  TGC Cys  ACG Thr 495 CCT Pro  TGG Trp  GAC Asp	2616 2664 2712 2760 2808 2856 2904
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly GAC Asp GCC Ala 480 AAT Asn TTG Leu CCT Pro	GGC Gly GGC Gly 465 CCC Pro CTC Leu TGG Trp CGC Arg	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450 GGA Gly TAC Tyr ACT Thr TCG Ser GCT Ala 530 GGT	GGT Gly GTT Val 435 GTC Val GTG Val AAG Lys TCC Ser GAG Glu 515 GCT Ala AGA	Asp GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr AAC Asn ACC Thr TCC Ser 500 CAG Gln GCT Ala AAG	Val 405 GGT Gly ACC Thr AAC Asn TTC Phe TGG Trp 485 GAA Glu GTC Val CTG Leu CGT	Pro AAC Asn TCC Ser GAC Asp AAC Asn 470 CAG Gln GCG Ala GAC Asp GGT Gly ACC	ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455 TAC Tyr CGC Arg AAG Lys GAT Asp GAG Glu 535 ACC	Asp  AAG Lys  TTC Phe 440 CGC Arg  GGC Gly  ATC Ile  CAC His  GTG Val 520 CTT Leu  AGC	Val  AAA Lys 425 CTC Leu  TAC Tyr  GGC Gly  TAC Tyr  ATT Ile 505 ACC Thr  GTC Val  TTT	Ile 410 CTC Leu  TAC Tyr  AAC Asn  GAC Asp 490 ATC Ile  GTC Val  TGG Trp  ACT	Met ACC Thr CTC Leu GTG Val GGT Gly 475 TAC Tyr GGC Gly TCC Ser TCT Ser	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460 GGC Gly GAC Asp GCC Ala AGC Ser GGT Gly 540 CGT	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC Ser TCC Ser TTC Phe GAG Glu GTG Val 525 AAC Asn	Trp  GGC Gly 430 GGG Gly  AAC Asn  TGG Trp  CTC Leu  GCT Ala 510 TTC Phe  CGT Arg	Asn 415 TAC Tyr  CGC Arg  ACC Thr  TGC Cys  ACG Thr 495 CCT Pro  TGG Trp  GAC Asp	2616 2664 2712 2760 2808 2856
Glu 400 AGC Ser GAC Asp GGC Gly GAC Asp GCC Ala 480 AAT Asn TTG Leu CCT Pro	GGC Gly GGC Gly 465 CCC Pro CTC Leu TGG Trp CGC Arg	GAG Glu GTC Val TAT Tyr 450 GGA Gly TAC Tyr ACT Thr TCG Ser GCT Ala 530 GGT	GGT Gly GTT Val 435 GTC Val GTG Val AAG Lys TCC Ser GAG Glu 515 GCT Ala AGA	Asp GAG Glu 420 TCG Ser ACC Thr AAC Asn ACC Thr TCC Ser 500 CAG Gln GCT Ala AAG	Val 405 GGT Gly ACC Thr AAC Asn TTC Phe TGG Trp 485 GAA Glu GTC Val CTG Leu CGT	Pro AAC Asn TCC Ser GAC Asp AAC Asn 470 CAG Gln GCG Ala GAC Asp GGT Gly ACC	ATC Ile GAT Asp GCC Ala 455 TAC Tyr CGC Arg AAG Lys GAT Asp GAG Glu 535 ACC	Asp  AAG Lys  TTC Phe 440 CGC Arg  GGC Gly  ATC Ile  CAC His  GTG Val 520 CTT Leu  AGC	Val  AAA Lys 425 CTC Leu  TAC Tyr  GGC Gly  TAC Tyr  ATT Ile 505 ACC Thr  GTC Val  TTT	Ile 410 CTC Leu  TAC Tyr  AAC Asn  GAC Asp 490 ATC Ile  GTC Val  TGG Trp  ACT	Met ACC Thr CTC Leu GTG Val GGT Gly 475 TAC Tyr GGC Gly TCC Ser TCT Ser	Gln TCC Ser GAC Asp CAG Gln 460 GGC Gly GAC Asp GCC Ala AGC Ser GGT Gly 540 CGT	Thr GCC Ala TGC Cys 445 AGC Ser TCC Ser TTC Phe GAG Glu GTG Val 525 AAC Asn	Trp  GGC Gly 430 GGG Gly  AAC Asn  TGG Trp  CTC Leu  GCT Ala 510 TTC Phe  CGT Arg	Asn 415 TAC Tyr  CGC Arg  ACC Thr  TGC Cys  ACG Thr 495 CCT Pro  TGG Trp  GAC Asp	2616 2664 2712 2760 2808 2856 2904

- 45 -

TTC CGT GA	A TAC CTC G	TT GCC AAT	GGT GTG ATG	GCT ACT GC	T CTT GTG	3048
	u Tyr Leu V	al Ala Asn	Gly Val Met	Ala Thr Al	a Leu Val	
560		65	570		575	
CCG AAG TA	T TGT CTG C	AG CAC CCT	CAT GCT TGC	GAC CTC TA	r aaa aac	3096
Pro Lys Ty:	r Cys Leu G	ln His Pro	His Ala Cys	Asp Leu Ty	r Lys Asn	
	580		585		590	
CAG ACT GT	A ATG TCT T	GATTGTGGT T	AAGCTGGAC T	GCTAGTGAG C	CTTACAACT	3151
Gln Thr Va				•		
	595					
		TTATTCTATC				3211
CAGGATACAT	GTCCCTGATC	AGTATACCAT	TTCACGTCCA	CATTCAATCT	TCAGCAACAC	3271
GAATTTATCC	AAACCAATCA	CCACCCTAGA	TCTACCACAA	CACTACCTTT	ATACATATCT	3331
		CCAACCAGGC				3391
CAGCCCCCCG	AGCCCAACCC	TCTCCACATA	TCCATACCCT	AATCAAAATC	ACCTTAATCT	3451
AAACAAATCC	ATCACGCCCA	AGGACCCCAC	AGACCTCCCC	TTCCCAACCC	ACCCAGTCCA	3511
CCTCCACAAA	CCAAACCCCA	AATCAGAACT	GCCGTGCAAC	TCTCCGTCTT	AGAACTCGCC	3571
		TAGATGGGCT				3631
		CACATGTAGT				3691
		GTGTGGCATG				3751
		ATCTAATATT				3811
		ACATGTGCAT				3871
		GTAGTCCCAT				3931
		ATCCCTGCTC				3991
GAGCTGGGGT	TTGGGTGTTG	CTGCATGCGT	ACGCCTACAT	ACGTAGGGAG	ATATGTTGCA	4051
CAGGATGCAG	GGAATGACAA	ATTGACGAAT	TGAGAAATAC	GCGAGTGGTT	AGATGTTAAT	4111
TCTCGTTCGG	GATGTTTATG	TTTACCTAGG	TATACTGGCT	GGGGGGTCGT	CATACACGTG	4171
GGAATTTGTG	GCAATCTGTC	AGTGGCCAGG	TCCTTGTTTG	ATTTATATGT	TTGGGATGGG	4231
		AGGAGGATGT				4291
		TTCCACGTCG				4351
		TCATGTGTCC				4411
		TGATCTCGCA				4471
		TTGTTTATGT				4531
GATTTGGGAT	AAGCTTCTAT	CCTGGGAATG	GGTGCTTGGT	ATAGTTCAGC	CTAGTACTTC	4591
		AAAATAGTAG				4651
		TTACCTGGCG				4711
		CGGGGTCCTT				4771
		TAATGCATGT				4831
		TTGAGGTTAC				4891
		AACTTCATTC				4951
		TATCTCATCT				5011
		TGATCGTGGA				5071
		GACTGCATTC				5131
		CCTGGTGTGT			CCTGGTCGAT	5191
TCTGACGTGC	GTATGTATCG	CTGGAAAGGC	TCGTAGGGGC	TGCGTCGAC		5240

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO.: 3

CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 2994 pares de bases

TIPO: nucléotidos NÚMERO DE HEBRAS: 2 WO 98/39459 PCT/ES98/00056

<del>-</del> 46 -

CONFIGURACIÓN: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

HIPOTETICA: NO

ANTI-SENTIDO: NO

FUENTE DE ORIGEN: Penicillium chrysogenum

FUENTE INMEDIATA: plásmidos pALP315 y pALP316

POSICION EN EL GENOMA: desconocida

CARACTERÍSTICA:

NOMBRE/CLAVE: secuencia codificante

SITUACIÓN: unir (494..500, 617..647, 846..901,

1047..1077, 1181..1952, 2022..2249)

CARACTERISTICA:

NOMBRE CLAVE: intrón

SITUACION: 501..616

CARACTERÍSTICA:

NOMBRE/CLAVE: intrón

SITUACION: 648..845

CARACTERISTICA:

NOMBRE/CLAVE: intrón

SITUACION: 902..1046

CARACTERISTICA:

NOMBRE/CLAVE: intrón

SITUACION: 1078..1180

CARACTERISTICA:

NOMBRE/CLAVE: intrón

SITUACION: 1953..2021

CARACTERÍSTICA:

OTRAS INFORMACIONES: gen act

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA SEQ ID NO: 3

GAATTCAGCA	GCCTACGGAG	TCCATAAGAC	ACCAAGACAC	AGCCATTGTA	TGGATTATAT	60
ATGCCATGTA	TGCCTGACAA	TGCTGTATAA	GTACTGTAAT	ACAAGGTAAA	CCCCCAACCC	120
GGTCAAGGTA						180
TTTAGGTAGA						240
CCTTATAATC	TTTATAAGTA	TAAAAATCAG	AAAGAGAATT	ATATACAAAA	GGGTAGATCT	300
GGAGGGGGTT	CAGAGTTAAG	GCCTCAGGCA	GGCGCACAAT	CCCAGCCATC	ACAAACCCCT	360
CTCCACTCTT	CCCTCTCTCT	CTCTTCCTTC	TTCCTTTCTC	CCCTAATCCC	AACTATATCC	420

CCT	CTAA ATCA	CCT GTC	ACA .	CCAT ATG ( Met (	GAG	TCTT G GT.	TTCT ATGT	T TT	TTCC CCA	CCTC GTTG	TTC TGG	TCCC CCAC	CTA ATCA	AGTC GC A	CCTTGT GCTTCC	480 538
CGG	AAGC'	TCC			דידי כי	GCCA	ר א כי כי	т тс	יייי ע בי	CCAT	יינטינט ע	TOOO	יחיתול	~ n ~ n	ACTAAC	
CCG	TATA'	TCT	CATT	ATAG	ממ	GAA	CTT	ב בכי	CCT	CTC	ATI	TGCG.	AAI	GACA	ACTAAC	598
			C. 1. 1.	TIAG		Glu										647
					Olu	Olu	5	Aia	Aid	Leu	vai	10	Asp	ASI	GIY	
GTA'	TGTG	CTA	таст′	יייירי דייירי	ככ כ	GGAG	_	T GG	רייירכי	ייייטי	ccc		CC 7	ת מיינים	AGCCCC	
GGT	CGCA	GTC	GTTG	CAC	בכ כי	TAAT		L CG	CGAC	3GCV	CAT	ים א היים מרש אי	CCA.	ACIC.	CAATGG	707
CTT	TCCA	TCT	CGCT	CAC	מא כי	TACC	AGAG	C CC	CATC	מממר	CAL	מטאא דארא	ICC .	AICC	TGATAC	767
TGA	TAT	TTG	CGAT	ATAG	TT	CG G	GT A	TG T	GT A	AG G	מתכ רר פ	TACA	TC C	CC C	GT GAC	827
															ly Asp	879
						1			, - <b>-</b> ,	,	2		iic A	1 a G	ry wab	
GAC	GCA	CCA	CGA	GCT	GTT	TTC	C G	TAAG'	TCCA	ACC	CCAC	AGA :	ידבידב	GACA	CC	930
Asp	Ala	Pro	Arg	Ala	Val	Phe								Or ICI	CC	230
25					30											
CCT	CCTG	TGC (	GAAG	GCCG	CC A	rccc	ACCA	A CC	CTTG	CGTC	GGA	TGGC'	י ידיד	دردس	CTTTTG	990
CTT	GGCT	AGG .	AGGA	ACCTO	GG A	ACCT	AGGA	A AT	CAAA	TAAC	TGA	CAAA	ATT	CAAC	AG	1046
CT 7	rcc 2	ATT (	GTC (	GT (	CGT	ccc (	CGC (	CAC	CAT	3G (	TAA	ATGA	TC C		TTTTT	1097
Pro	Ser	Ile	Val	Glv	Arq	Pro	Ara	His	His	Glv	J 1. L L				1111	1097
			35	•	_			40		1						
TTT	CCGG	CTC	GTTT(	GGC:	rg T	ATAC	GCTA:		GCAG	CCAA	TTT	GATC	CT I	AATG	AACCAA	1157
AAA	GAAT	ACT I	AACA:	rggg	CG CZ	AG T	ATT	ATG	ATT	GGT	ATG	GGT	CAG	AAG	GAC	1208
														Lys		1200
									45	4		2		50		
TCG	TAC	GTT	GGT	GAT	GAG	GCA	CAG	TCG	AAG	CGT	GGT	ATC	CTC		СТС	1256
Ser	Tyr	Val	Gly	Asp	Glu	Ala	Gln	Ser	Lvs	Arq	Glv	Ile	Leu	Thr	Leu	1230
			55	-				60		5	1		65		200	
CGT	TAC	CCT	ATT	GAG	CAC	GGT	GTT	GTC	ACC	AAC	TGG	GAC		ATG	GAG	1304
Arg	Tyr	Pro	Ile	Glu	His	Gly	Val	Val	Thr	Asn	Trp	Asp	Asp	Met	Glu	
		70				-	75				*	80	_			
AAG	ATC	TGG	CAC	CAC	ACC	TTC	TAC	AAC	GAG	CTC	CGT	GTT	GCC	CCC	GAA	1352
Lys	Ile	Trp	His	His	Thr	Phe	Tyr	Asn	Glu	Leu	Arg	Val	Ala	Pro	Glu	
	85					90					95					
GAG	CAC	CCC	ATT	CTC	TTG	ACC	GAA	GCT	CCC	ATC	AAC	CCC	AAG	TTC	AAC	1400
Glu	His	Pro	Ile	Leu	Leu	Thr	Glu	Ala	Pro	Ile	Asn	Pro	Lys	Phe	Asn	
100					105					110					115	
						ATC										1448
Arg	Glu	Lys	Met	Thr	Gln	Ile	Val	Phe	Glu	Thr	Phe	Asn	Ala	Pro	Ala	
				120					125					130		
TTC	TAC	GTC	TCC	ATC.	CAG	GCC	GTT	CTG	TCC	CTG	TAC	GCC	TCC	GGT	CGT	1496
Phe	Tyr	Val	Ser	Ile	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Leu	Tyr	Ala	Ser	Gly	Arg	
			135					140					145			
ACC	ACT	GGT	ATC	GTT	CTC	GAC	TCC	GGT	GAC	GGT	GTC	ACC	CAC	GTC	GTC	1544
Thr	Thr		Ile	Val	Leu	Asp	Ser	Gly	Asp	Gly	Val	Thr	His	Val	Val	
~~-		150					155					160				
CCC	ATC	TAC	GAG	GGT	TTC	TCT	CTG	CCC	CAC	GCT	ATC	TCG	CGT	GTC	GAC	1592
rro	11e	Tyr	Glu	Gly	Phe	Ser	Leu	Pro	His	Ala		Ser	Arg	Val	Asp	
A TT C	165	~~~		~-		170					175					
MA-	GCT	GGC	CGT	GAT	CTG	ACC	GAC	TAC	CTG	ATG	AAG	ATC	CTC	GCT	GAG	1640
100	нта	GΙΥ	arg	Asp		Thr	Asp	Tyr	Leu		Lys	Ile	Leu	Ala		
180	COM	m z ~	7.00	-	185	<b>3</b> ~ ~			<b>~-</b> -	190					195	
7 ~~ CGT	GG I	TAC	ACT	TTC	TCC	ACC	ACC	GCC	GAG	CGT	GAA	ATC	GTC	CGT	GAC	1688
Arg	GIŸ	ryr	ınr		ser	Thr	Thr	Ala		Arg	Glu	Ile	Val		Asp	
				200					205					210		

- 48 -

ATC AAG GAG AAG CTT TGC TAC GTC GCC CTC GAC TTC GAG CAG GAG ATC	1736
lle Lys Glu Lys Leu Cys Tyr Val Ala Leu Asp Phe Glu Gln Glu Ile	
215 220 225	
CAG ACC GCT TCC CAG AGC TCC AGC CTC GAG AAG TCC TAC GAG CTT CCC	1784
Gln Thr Ala Ser Gln Ser Ser Ser Leu Glu Lys Ser Tyr Glu Leu Pro	
240	
GAT GGA CAG GTC ATC ACT ATT GGC AAC GAG CGC TTC CGT GCT CCT GAG Asp Gly Gln Val Ile Thr Ile Gly Asn Glu Arg Phe Arg Ala Pro Glu	1832
245 250 255	
GCT CTG TTC CAG CCT AAC GTT CTT GGC CTC GAG TCT GGC GGT ATC CAC	7.000
Ala Leu Phe Gln Pro Asn Val Leu Gly Leu Glu Ser Gly Gly Ile His	1880
260 265 270 275	
GTC ACC ACC TTC AAC TCC ATC ATG AAG TGT GAT GTT GAT GTC CGT AAG	1928
Val Thr Thr Phe Asn Ser Ile Met Lys Cys Asp Val Asp Val Arg Lys	
280 285 290	
GAT CTC TAC GGC AAC ATT GTC ATG GTAAGAAAAA AGCCTCCAGA GCTGATGTTG	1982
Asp Leu Tyr Gly Asn Ile Val Met	
295	
CGCAAAGATC CCCACTAACA TACAACTCCT TTTTTTTAG TCT GGT GGT ACC ACC	2036
Ser Gly Gly Thr Thr	
300 ATG TAC CCC GGT ATC TCC GAC CGT ATG CAG AAG GAG ATC ACT GCT CTT	2224
Met Tyr Pro Gly Ile Ser Asp Arg Met Gln Lys Glu Ile Thr Ala Leu	2084
305 310 315 320	
GCT CCT TCT TCC ATG AAG GTC AAG ATC ATC GCT CCC CCC GAG CGC AAG	2132
Ala Pro Ser Ser Met Lys Val Lys Ile Ile Ala Pro Pro Glu Arg Lys	2172
325 330 335	
TAC TCC GTC TGG ATC GGT GGA TCC ATT CTG GCC TCC CTG TCG ACC TTC	2180
Tyr Ser Val Trp Ile Gly Gly Ser Ile Leu Ala Ser Leu Ser Thr Phe	
340 345 350	
CAG CAG ATG TGG ATC TCC AAG CAG GAG TAC GAC GAG AGC GGT CCT TCC	2228
Gln Gln Met Trp Ile Ser Lys Gln Glu Tyr Asp Glu Ser Gly Pro Ser	
355 ATC GTT CAC CGC AAG TGC TTC TAAGCTTCTT GCAGCACTTT ACTACTCGTA	
Ile Val His Arg Lys Cys Phe	2279
370 375	
TTCGCTCGTA CTTTCCTGGT GTATCAAAAA GCAGGATGGA GGCACTGGTG GATTGCAAGC	2339
GTTGTTGGAC TCGCATTATC AAGCGGATAG CCTGAAAATG GAATCTCGAT TTTAGTGGAA	2399
TAGAGTCGGT CGTTTTCTTT TTGTTACTCT TTACCTTACT CTTTACTCGA TCTCTATCCA	2459
TCCATTTCTG CTTTGAACCA TTTCACCTTT ACTCCATCTT TTTCCCTTTC CTCATTCGAA	2519
TCCGCTGTCC CGTCCACCTC TCTGATTGTT TTGCCTGGAC GGGTCTCTGG CGATGCGGCA	2579
TCAACAGTGT ACCTGTAGGG CAAGGATGTA TATGGAGTTG GTTGGCTATA GGGATTAGGT	2639
TGCGTTGTCC TTTTCGACGT CTTCTACGTC TTTGTTCTAG CCCCTTGCGT TGTCTTCAAC	2699
TAAACTGCCC TTGTCCGTAG CTTTTAACGT GACTTTGACT TCAAATATTC CACTGGTTCC	2759
TTGTATTCTG CTAGAAACGC TGGTTCAACG CTTGTTGAAT GTCTTCTATG TCCAACATCT	2819
CACCCCCAT TACCCCTTTC TO	2879
ATTCTCCCA A TATCTACCO CACA CACA CACA CAC	2939
droughtar algebrack lighted attent	2994

INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO.: 4

# CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 3240 pares de bases

TIPO: nucléotidos

WO 98/39459 PCT/ES98/00056

- 49 -

NÚMERO DE HEBRAS: 2 CONFIGURACIÓN: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

HIPOTETICA: NO ANTI-SENTIDO: NO

FUENTE DE ORIGEN: Penicillium chrysogenum FUENTE INMEDIATA: plásmidos pALC52 y pALC53

POSICION EN EL GENOMA: desconocida

CARACTERÍSTICA:

NOMBRE/CLAVE: secuencia codificante

SITUACIÓN: unir (787..793, 921..951, 1124..1179,

1290..1320, 1411..2182, 2250..2477)

CARACTERISTICA:

NOMBRE/CLAVE: intrón SITUACION: 794..920

CARACTERISTICA:

NOMBRE/CLAVE: intrón SITUACION: 952..1123

CARACTERISTICA:

NOMBRE/CLAVE: intrón SITUACION: 1180..1289

CARACTERISTICA:

NOMBRE/CLAVE: intrón SITUACION: 1321..1410

CARACTERISTICA:

NOMBRE/CLAVE: intrón SITUACION: 2183..2249

CARACTERISTICA:

OTRAS INFORMACIONES: gen act

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4

GCCAGGCTGG CACCGGCCTG CCTTGATGCG AGATGCCTAC TCGTACTATG CCTACAGGTA 60 TGGGCTTTCC GCGTGTCGTC AGCTTGCGAC CGCGCGGCTG CTGACGACCC AAGGCAAGCT 120 GGTAACATGG CGGCACGAAA TTTCTCTCTG CCTGCTCGTC CTCTTGGTGT GGAGGGGTAC 180 GAGTGCAGGT ATGATGGGAC GGCAGAGGAG TGACGGAGGC TGTGCGGTTG GCACGAGTAC 240 TGTACGAGTA CTCGTACTGT AGGTGCAGCG ACTGTGGTGG TACTGCTAGG TGGAATTGGG 300 TCCAGCAGGC ATGCAGCTCC CAGCCACCGT CGTTAACCAA TCAGTTAAAG CAGCAACGCA 360 ACCCGCCCC GTTTTCTGC CAGAAATTTG GGCGGTGTCG TGCCCCCAGT CGCTGTTGCC 420 CGCCCTTGTC TGGTCGCCTA CAGGCTGCAC CACAGGTAAC AACAGCCCGC CCCAGGTCCT 480

TGGA AGCC CCCT CTTC	AAGC( CAAC( CCT( CTTGA GCC A	CCA TO CONTRACT OF	CAG CTCT CACG CTCT CGAG (	rgato CCCCO rcgao ETCA:	GC TT CC GT CC AT	FCCCT FCTCC FCCTT CTTCC	CCT CATT CCCC CTTA	TCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	CCCC TCTT( CAGC( AACC)	TCCA CTTC CCCA CCTT	CATO TCTO CGAO TACO	CTCA( CCAC( CATC' CGCT(	CTC A GAC ( TGC A CTT (	AGCT( CCTT) ATCG: CCCG:	CGGACT CACGCA AAGAGT CCTGGG IAATCC C CCTA	540 600 660 720 780 837
TCG( GGC1	CGC 3	- ATCC#	ACACO CTTO	GG C	GCCG( FTCA(	CAG	AG (	GAG ( Glu V	GTC (	GCC (	AGGG: GCC ( Ala )	CTC (	GTT Z Val :	ATC (		896 946
AAT Asn	GG Gly	GTA	AGCTO	CGC (	CCGC	rgtc:	rc a	CCGA	CATC	C ATO	CGTC	CCCC			rgt	1001
	4	GA (	GCCT	CAG	G G	rccc	TTCG	A CGA	AGCG	CGTC	GAT	rgcc	. בבב	ልጥሮርን	AACGAG	1061
ATC	GGCC	CAT A	ACTGA	AGCC	GA CA	ACTC	GTGT(	G TT	TTCT	GGAC	ATT	AGGA	CTG A	ACTT	GATTCT	1121
															C CGA	1169
	Sei	Gly 15	/ Met	Cys	s Lys	s Ala	a Gly 20	y Phe	e Ala	a Gly	y Ası	Ası 25	o Ala	a Pro	o Arg	
GCT	GTT		C GT	CAAG	TACCO	CAC		־מככ	ССТС	CAGO	ידר (		מדדפי	דר כז	ACCGCCAGG	1220
Ala	Val 30	Phe							COI	20210		Jech	1110.	ic cr	-ccoccago	1229
GCGA		GG (	GCAC	SAACO	G GC	GCAA	ACTG	C ATO	EGCA	AACA	TGG	יממדי	דיר מ	TATGO	CGACAG	1289
															CAGCC	1340
						Pro										
GAC	ACCTO	CTC A	ACCC	cccc	CC GC	GGGG	GCTC	TA	AGCGZ	AGTC	AGC	GCTG	GTT (	CTGA	CCGCTG	1400
GATA	ACTAI	rag (	ATC	CATO	G ATO	GGG	CAT	GG(	CAC	G AAC	GA(	TC	G TA	GTO	GGT	1450
			$11\epsilon$	e Met	: Ile	e Gly	/ Met	Gl ₃	y Gli	n Lys	s Ası	Se:	r Ty	r Val	l Gly	
a. a					45					50					55	
						CGT										1498
				60		Arg			65					70		
GAG	CAC	GGT	GTT	GTC	ACC	AAC	TGG	GAC	GAC	ATG	GAG	AAG	ATC	TGG	CAC	1546
			75			Asn		80					85			
CAC	ACC	TTC	TAC	AAC	GAG	CTG	CGT	GTT	GCC	CCC	GAG	GAG	CAC	CCG	GTC	1594
His	Thr		Tyr	Asn	Glu	Leu		Val	Ala	Pro	Glu	Glu	His	Pro	Val	
СТС	C.T.C.	90	~~~	~~~	~~~		95					100				
						ATC										1642
пец	105	TILL	GIU	Ala	Pro	Ile 110	Asn	Pro	ràs	Ser		Arg	Glu	Lys	Met	
ACC		АТС	CTC	דידיכי	GAG	ACC	ттс	አአር	CCC	CCT	115	TTC	TAC	CTC.	TCC	1.600
Thr	Gln	Tle	Val	Phe	Glu	Thr	Dhe	Acn	Δla	Dro	Λla	Dhe	Tire	UIC	202	1690
120					125			AUII	niu	130	nia	FIIC	TYL	vai.	135	
ATC	CAG	GCC	GTC	CTG		CTG	TAC	GCC	TCC		CGT	ACG	ACC	GGT		1738
Ile	Ġln	Ala	Val	Leu	Ser	Leu	Tyr	Ala	Ser	Glv	Ara	Thr	Thr	Glv	Ile	1,50
				140			•		145	-				150		
GTC	CTG	GAC	TCT	GGT	GAT	GGT	GTC	ACC	CAC	GTT	GTC	CCC	ATC	TAC	GAG	1786
Val	Leu	Asp	Ser	Gly	Asp	Gly	Val	Thr	His	Val	Val	Pro	Ile	Tyr	Glu	
a	-	<b>a</b> = -	155			_		160					165			
GGT'	TTC	GCC	CTG	CCC	CAC	GCC	ATT	GCC	CGT	GTC	GAC	ATG	GCT	GGT	CGT	1834
σтλ	rne		Leu	Pro	HIS	Ala		Ala	Arg	Val	Asp		Ala	Gly	Arg	
מאיד	CTC	170	CAC	<b>ም</b> አ ረ	CTC	. n ma	175	7 m~	~m~	~~~	C7 C	180	~~~	<b></b>		
Acn	T.e.ii	Thr	GAC Δ~~	THE	T.A.	ATG Met	AAG	ATC	T	GCC	GAG	CGC	GGC	TAC	ACC	1882
	185	1117	usħ	тут	neu	190	пЛЭ	ıre	Leu	AId	195	Arg	GIY	ıyr	rnr	

- 51 -

TTC	TCC	ACC	ACG	GCC	GAG	CGT	GAG	ATT	GTC	CGT	GAC	ATC	AAG	GAG	AAG	1930
Phe	Ser	Thr	Thr	Ala	Glu	Arg	Glu	Ile	Val	Arq	Asp	Ile	Lvs	Glu	Lvs	
200					205	_				210	_	_			215	
CTC	TGC	TAC	GTC	GCC	CTC	GAC	ጥጥር	GAG	CAG		ΔТС	CAG	ΔΟΤ	GCC	GCC	1978
Leu	Cvs	Tvr	Val	Ala	Leu	Asp	Phe	Glu	Gln	Glu	Tle	Gln	Thr	Ala	712	1970
	4	-		220				O-Lu	225	G.L.u	110	GIII	1111	230	Ala	
CAG	AGC	TCC	AGC		CAC	220	TCC	TAC		CTT	CCC	CAC	caa	CAG	ama.	0006
Gln	Ser	Ser	Sar	LOU	Clu	I	200	TAC	CAG	C 1 1	200	CAC	93	CAG	GIC	2026
GIII	DCI	261	235	ьец	Giu	гуѕ	ser		GIU	Leu	Pro	Asp		Gln	Val	
አ ጥር	N.C.C	אידית	_	ת ת	C A C	~~~	mma	240		000	~~~		245			
														TTC		2074
116	TILL		GIY	ASI	GIU	Arg		Arg	Ala	Pro	Glu		Leu	Phe	Gln	
000	maa	250	~~~	~~-			255					260				
-	TCC	GTC	CTG	GGT	CTC	GAG	AGC	GGC	GGC	ATC	CAC	GTC	ACC	ACC	TTC	2122
Pro		Vai	Leu	Gly	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Ile	His	Val	Thr	Thr	Phe	
	265					270					275					
														TAC		2170
Asn	Ser	Ile	Met	Lys	Cys	Asp	Val	Asp	Val	Arg	Lys	Asp	Leu	Tyr	Gly	
280					285					290					295	
AAC	ATT	GTC	ATG	GTA	AGTC	AGA 1	TGCC	GGC	CT GO	SAAG	ACAC	TC	ATTT.	AGGA	TCT	2225
Asn	Ile	Val	Met													
TGCT	CAAC	ACC.	AATT:	TTT	CTTT	rag :	CT (	GT (	GGT A	ACC A	ACC A	ATG T	rac (	CCT C	GC	2276
														Pro C		
							300	-	-			305	•		•	
CTC	TCT	GAC	CGT	ATG	CAG	AAG	GAG	ATC	ACT	GCT	CTT	GCT	CCT	TCT	TCC	2324
														Ser		
	310	•	_			315					320					
ATG	AAG	GTC	AAG	ATC	АТТ		CCC	CCG	GAG	CGC		TAC	TCC	GTC	TGG	2372
Met	Lvs	Val	Lvs	Tle	Tle	Ala	Pro	Pro	Glu	Ara	Lvs	Tyr	Ser	Val	Trn	2312
325	-1-		-10		330		110	110	Olu	335	цуз	1 7 1	361	Val	340	
ATC	GGT	GGT	TCC	ΑΤΤ		GCG	тст	CTG	тсс		ттс	CAG	CAG	ATG		2420
														Met		2420
		G-1	501	345	ncu.	nia	Jer	nea	350	1111	FILE	GIII	GIII	355	ırp	
ΔΤα	TCG	AAG	CAG		TAC	CAC	CAC	ACC		ccc	TCC	אתר	CTIC	CAC	ccc	2460
														His		2468
110	301	цуs	360	Giu	Ιγι	ASP	GIU		GIY	PLO	ser	iie		HIS	Arg	
λAC	TCC	ጥጥር		יכייאי			~m~~	365		7.C. 7. E. 7			370	3.000		
				3G I A .	LGI .	LGIC	ع ۲ ر رور	£A تاد	40000	GAT	A CCC	GAA.	IGIA	AGG	TTGACAG	2527
ryy	Cys															
amma	7/17 7 7	375														
															GAACGC	2587
CAAC	AIGI	I'CG	GAGT	CGGTC	G CC	JACC	GATG	CAAC	CGTCT	ract	CAC	STGC	GCG (	CGTAI	CCCAC	2647
TCAA	AGTC'I	rca -	TATT.	racg <i>i</i>	AA AA	AGTT	ATTT	C AC	ATGGT	CAG	GCGC	GTGG:	rgg (	GCGTI	GCCTT	2707
															GCGAGC	2767
															CTAGAC	2827
															CAGGC	2887
															CGAGGT	2947
															CAGTG	3007
															CAATA	3067
															CGCCG	3127
															GCTTG	3187
														GAC		3240

- 52 -

#### INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO.: 5

## CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 461 aminoácidos

TIPO: aminoácidos NÚMERO DE HEBRAS: 1 CONFIGURACIÓN: lineal TIPO DE MOLÉCULA: péptido

FUENTE DE ORIGEN: Penicillium chrysogenum

CARACTERÍSTICA:

OTRAS INFORMACIONES: secuencia de aas del enzima glutamato deshidrogenasa (EC.1.4.1.4) de 49837 Da de peso molecular

#### DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5

Met Met Gln Asn Leu Pro Phe Glu Pro Glu Phe Glu Gln Ala Tyr 10 Lys Glu Leu Ala Ser Thr Leu Glu Asn Ser Thr Leu Phe Gln Lys 25 Lys Pro Glu Tyr Arg Lys Ala Leu Gln Val Val Ser Val Pro Glu 35 40 Arg Val Ile Gln Phe Arg Val Val Trp Glu Asp Asp Lys Gly Gln 50 55 Val Gln Ile Asn Arg Gly Tyr Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu 65 70 Gly Pro Tyr Lys Gly Gly Leu Arg Phe His Pro Thr Val Asn Leu 80 Ser Ile Leu Lys Phe Leu Gly Phe Glu Gln Ile Phe Lys Asn Ala Leu Thr Gly Leu Asn Met Gly Gly Gly Lys Gly Gly Ser Asp Phe Asp Pro Lys Gly Lys Thr Asp Asn Glu Ile Arg Arg Phe Cys Val 130 Ser Phe Met Thr Glu Leu Cys Lys His Ile Gly Ala Asp Thr Asp 145 Val Pro Ala Gly Asp Ile Gly Val Thr Gly Arg Glu Val Gly Phe 155 160 Met Phe Gly Gln Tyr Lys Lys Ile Arg Asn Gln Trp Glu Gly Val 170 175 Leu Thr Gly Lys Gly Gly Ser Trp Gly Gly Ser Leu Ile Arg Pro 185 190 Glu Ala Thr Gly Tyr Gly Val Val Tyr Tyr Val Glu His Met Ile 200 205 Gln His Ala Ser Gly Gly Lys Glu Ser Phe Ala Gly Lys Arg Val 215 220

- 53 -

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Asn Val Ala Gln Tyr Ala Ala Leu Lys Val Ile Glu Leu Gly Gly Ser Val Ile Ser Leu Ser Asp Ser Gln 250 Gly Ala Leu Val Leu Asn Gly Glu Glu Gly Ser Phe Thr Ala Glu 260 265 Glu Ile Asn Thr Ile Ala Glu Ile Lys Val Gln Arg Lys Gln Ile 275 280 Ala Glu Leu Ala Thr Gln Asp Ala Phe Ser Ser Lys Phe Lys Tyr 290 295 Ile Pro Gly Ala Arg Pro Trp Thr Asn Ile Ala Gly Arg Ile Asp 305 310 Val Ala Leu Pro Ser Ala Thr Gln Asn Glu Val Ser Gly Asp Glu 320 325 Ala Lys Ala Leu Ile Ala Ala Gly Cys Lys Phe Ile Ala Glu Gly 335 340 Ser Asn Met Gly Ser Thr Gln Glu Ala Ile Asp Val Phe Glu Ala 355 His Arg Asp Ala Asn Pro Gly Ala Ala Ile Trp Tyr Ala Pro Gly Lys Ala Ala Asn Ala Gly Gly Val Ala Val Ser Gly Leu Glu 385 Met Ala Gln Asn Ser Ala Arg Val Asn Trp Ser Arg Glu Glu Val 395 400 Asp Ser Arg Leu Lys Lys Ile Met Glu Asp Cys Phe Asn Asn Gly 410 415 Leu Ser Thr Ala Lys Glu Tyr Val Thr Pro Ala Glu Gly Val Leu 425 430 Pro Ser Leu Val Ala Gly Ser Asn Ile Ala Gly Phe Thr Lys Val 440 445 Ala Glu Ala Met Lys Glu His Gly Asp Trp Trp

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO.: 6

CARACTERISTICA DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 596 aas

TIPO: Aminoácidos

NUMERO DE HEBRAS: 1

CONFIGURACION: Lineal

TIPO DE MOLECULA: Péptido

FUENTE DE ORIGEN: Penicillium chrysogenum

CARACTERISTICA:

OTRA INFORMACION: Secuencia de aas del enzima  $\beta\text{-N-acetilhexosaminidasa}$  (EC.3.2.1.52) de 66545 Da de peso molecular.

- 54 -

## DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6

Met 1	Lys	Phe	Ala	Ser 5	Val	Leu	Asn	Val	Leu 10	Gly	Ala	Leu		Ala 15
Ala	Ser	Ala	Val	Gln 20	Val	Asn	Pro	Leu	Pro 25	Ala	Pro	Arg		
Thr	Trp	Gly	Ser	Ser 35	Gly	Pro	Ile	Gln	Val 40	Asn	Asn	Leu	Asn	
Asn	Gly	Pro	His	Ser 50	Pro	Leu	Leu	Thr	Gln 55	Ala	Trp	Glu	Arg	-
Trp	Glu	Thr	Ile	Thr 65	Thr	Leu	Gln	Trp	Val 70	Pro	Ala	Ala	Val	
Ser	Pro	Ile	Ala	Ser 80	Tyr	Pro	Ala	Phe	Pro 85	Thr	Ser	Thr	Pro	Val 90
Ser	Ser	Ala	Pro	Lys 95	Ala	Lys	Arg	Ala	Pro 100	Ser	Gly	Ile	His	Asn 105
Val	Asp	Val	His	Val 110	Val	Asp	Asn	Asp	Ala 115	Asp	Leu	Gln	Tyr	
Val	Asp	Glu	Ser	Tyr 125	Thr	Leu	Val	Val	Ser 130	Asp	Gly	Gly	Ile	Arg 135
Ile	Asn	Ser	Gln	Thr 140	Val	Trp	Gly	Val	Leu 145	Gln	Ala	Phe	Thr	Thr 150
Leu	Gln	Gln	Ile	Ile 155	Ile	Ser	Asp	Gly	Lys 160	Gly	Gly	Leu	Ile	Ile 165
Glu	Gln	Pro	Val	Lys 170	Ile	Lys	Asp	Ala	Pro 175	Leu	Tyr	Pro	His	Arg 180
Gly	Ile	Met	Ile	Asp 185	Thr	Gly	Arg	Asn	Phe 190	Ile	Thr	Val	Arg	Lys 195
Leu	Leu	Glu	Gln	Ile 200	Asp	Gly	Met	Ala	Leu 205	Ser	Lys	Leu	Asn	Val 210
Leu	His	Trp	His	Leu 215	Asp	Asp	Ser	Gln	Ser 220	Trp	Pro	Met	Gln	Met 225
Ser	Ser	Tyr	Pro	Glu 230	Met	Thr	Lys	Asp	Ala 235	Tyr	Ser	Pro	Arg	Glu 240
Ile	Tyr	Thr	Glu	His 245	Asp	Met	Arg	Arg	Val 250	Ile	Ala	Tyr	Ala	Arg 255
Ala	Arg	Gly	Val	Arg 260	Val	Ile	Pro	Glu	Val 265	Asp	Met	Pro	Ala	His 270
Ser	Ala	Ser	Gly	Trp 275	Gln	Gln	Val	Asp	Pro 280	Glu	Ile	Val	Ala	Cys 285
Ala	Glu	Ser	Trp	Trp 290	Ser	Asn	Asp	Val	Trp 295	Ala	Glu	His	Thr	Ala 300
Val	Gln	Pro	Asn	Pro 305	Gly	Gln	Leu	Asp	Ile 310	Ile	Tyr	Pro	Lys	Thr 315
Tyr	Glu	Val	Val	Asn 320	Asn	Val	Tyr	Gln	Glu 325	Leu	Ser	Arg	Ile	Phe 330
Ser	Asp	Asn	Leu	Phe 335	His	Val	Gly	Ala	Asp 340	Glu	Ile	Gln	Pro	Asn 345
Cys	Tyr	Asn	Tyr	Ser 350	Thr	His	Ile	Thr	Lys 3 <b>5</b> 5	Trp	Phe	Ala	Glu	Asp 360
Pro	Ser	Arg	Thr	Tyr 365	Asn	Asp	Leu	Ala	Gln 370	Tyr	Trp	Val	Asp	His 375
Ser	Met	Pro	Ile	Phe 380	Arg	Ser	Val	Gly	Asp 385	His	Arg	Arg	Leu	Met 390

- 55 -

Met Trp Glu Asp Ile Ala Ile Ala Thr Glu Ser Ala His Asp Val 395 400 Pro Lys Asp Val Ile Met Gln Thr Trp Asn Ser Gly Glu Gly Glu 415 Gly Asn Ile Lys Lys Leu Thr Ser Ala Gly Tyr Asp Val Val 430 435 Ser Thr Ser Asp Phe Leu Tyr Leu Asp Cys Gly Arg Gly Gly Tyr 440 445 Val Thr Asn Asp Ala Arg Tyr Asn Val Gln Ser Asn Thr Asp Gly 455 460 465 Gly Val Asn Phe Asn Tyr Gly Gly Asp Gly Gly Ser Trp Cys Ala 470 475 Pro Tyr Lys Thr Trp Gln Arg Ile Tyr Asp Tyr Asp Phe Leu Thr 485 490 495 Asn Leu Thr Ser Ser Glu Ala Lys His Ile Ile Gly Ala Glu Ala 500 505 Pro Leu Trp Ser Glu Gln Val Asp Asp Val Thr Val Ser Ser Val 515 520 Phe Trp Pro Arg Ala Ala Ala Leu Gly Glu Leu Val Trp Ser Gly 530 535 Asn Arg Asp Ala Ala Gly Arg Lys Arg Thr Thr Ser Phe Thr Gln 545 550 Arg Ile Leu Asn Phe Arg Glu Tyr Leu Val Ala Asn Gly Val Met 565 570 Ala Thr Ala Leu Val Pro Lys Tyr Cys Leu Gln His Pro His Ala 575 580 Cys Asp Leu Tyr Lys Asn Gln Thr Val Met Ser 590

INFORMACION PARA LA SEQ ID NO.: 7

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 375 aas

TIPO: aminoácidos

NUMERO DE HEBRAS: 1

CONFIGURACION: Lineal

TIPO DE MOLECULA: Péptido

FUENTE DE ORIGEN: Penicillium chrysogenum

CARACTERISTICA:

OTRAS INFORMACIONES: Secuencia de aas de la proteína y-actina de 41760 Da de peso molecular.

## DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7

Met 1	Glu	Glu	Glu	Val 5	Ala	Ala	Leu	Val	Ile 10	Asp	Asn	Gly	Ser	Gly 15
Met	Cys	Lys	Ala	Gly 20	Phe	Ala	Gly	Asp	Asp.	Ala	Pro	Arg	Ala	Val 30
Phe	Pro	Ser	Ile	Val 35	Gly	Arg	Pro	Arg	His 40	His	Gly	Ile	Met	
Gly	Met	Gly	Gln	Lys 50	Asp	Ser	Tyr	Val	Gly 55	Asp	Glu	Ala	Gln	
Lys	Arg	Gly	Ile	Leu 65	Thr	Leu	Arg	Tyr	Pro 70	Ile	Glu	His	Gly	
Val	Thr	Asn	Trp	Asp 80	Asp	Met	Glu	Lys	Ile 85	Trp	His	His	Thr	
Tyr	Asn	Glu	Leu	Arg 95	Val	Ala	Pro	Glu	Glu 100	His	Pro	Ile	Leu	
Thr	Glu	Ala	Pro	Ile 110	Asn	Pro	Lys	Phe	Asn 115	Arg	Glu	Lys	Met	Thr 120
Gln	Ile	Val	Phe	Glu 125	Thr	Phe	Asn	Ala	Pro 130	Ala	Phe	Tyr	Val	
Ile	Gln	Ala	Val	Leu 140	Ser	Leu	Tyr	Ala	Ser 145	Gly	Arg	Thr	Thr	
Ile	Val	Leu	Asp	Ser 155	Gly	Asp	Gly	Val	Thr 160	His	Val	Val	Pro	
Tyr	Glu	Gly	Phe	Ser 170	Leu	Pro	His	Ala	Ile 175	Ser	Arg	Val	Asp	
Ala	Gly	Arg	Asp	Leu 185	Thr	Asp	Tyr	Leu	Met 190	Lys	Ile	Leu	Ala	
Arg	Gly	Tyr	Thr	Phe 200	Ser	Thr	Thr	Ala	Glu 205	Arg	Glu	Ile	Val	
Asp	Ile	Lys	Glu	Lys 215	Leu	Cys	Tyr	Val	Ala 220	Leu	Asp	Phe	Glu	Gln 225
Glu	Ile	Gln	Thr	Ala 230	Ser	Gln	Ser	Ser	Ser 235	Leu	Glu	Lys	Ser	Tyr 240
Glu	Leu	Pro	Asp	Gly 245	Gln	Val	Ile	Thr	Ile 250	Gly	Asn	Glu	Arg	Phe 255
Arg	Ala	Pro	Glu	Ala 260	Leu	Phe	Gln	Pro	Asn 265	Val	Leu	Gly	Leu	Glu 270
Ser	Gly	Gly	Ile	His 275	Val	Thr	Thr	Phe	Asn 280	Ser	Ile	Met	Lys	Cys 285
Asp	Val	Asp	Val	Arg 290	Lys	Asp	Leu	Tyr	Gly 295	Asn	Ile	Val	Met	Ser 300
Gly	Gly	Thr	Thr	Met 305	Tyr	Pro	Gly	Ile	Ser 310	Asp	Arg	Met	Gln	Lys 315
Glu	Ile	Thr	Ala	Leu 320	Ala	Pro	Ser	Ser	Met 325	Lys	Val	Lys	Ile	Ile 330
Ala	Pro	Pro	Glu	Arg 335	Lys	Tyr	Ser	Val	Trp 340	Ile	Gly	Gly	Ser	Ile 345
Leu	Ala	Ser	Leu	Ser 350	Thr	Phe	Gln	Gln	Met 355	Trp	Ile	Ser	Lys	Gln 360
Glu	Tyr	Asp	Glu	Ser 365	Gly	Pro	Ser	Ile	Val 370	His	Arg	Lys	Cys	Phe 375

**-** 57 -

### INFORMACION PARA LA SEQ ID NO.: 8

#### CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 375 aas

TIPO: Aminoácidos

NUMERO DE HEBRAS: 1

CONFIGURACION: Lineal

TIPO DE MOLECULA: Péptido

FUENTE DE ORIGEN: Acremonium chrysogenum

#### CARACTERISTICA:

OTRAS INFORMACIONES: Secuencia de aas de la proteína  $\gamma$ -actina de 41612 Da de peso molecular.

#### DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8

Met Glu Glu Glu Val Ala Ala Leu Val Ile Asp Asn Gly Ser Gly 10 Met Cys Lys Ala Gly Phe Ala Gly Asp Asp Ala Pro Arg Ala Val 25 Phe Pro Ser Ile Val Gly Arg Pro Arg His His Gly Ile Met Ile 35 Gly Met Gly Gln Lys Asp Ser Tyr Val Gly Asp Glu Ala Gln Ser 50 55 Lys Arg Gly Ile Leu Thr Leu Arg Tyr Pro Ile Glu His Gly Val 65 70 Val Thr Asn Trp Asp Asp Met Glu Lys Ile Trp His His Thr Phe 80 85 Tyr Asn Glu Leu Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Val Leu Leu 95 100 Thr Glu Ala Pro Ile Asn Pro Lys Ser Asn Arg Glu Lys Met Thr 110 115 Gln Ile Val Phe Glu Thr Phe Asn Ala Pro Ala Phe Tyr Val Ser Ile Gln Ala Val Leu Ser Leu Tyr Ala Ser Gly Arg Thr Thr Gly 150 Ile Val Leu Asp Ser Gly Asp Gly Val Thr His Val Val Pro Ile 155 160 Tyr Glu Gly Phe Ala Leu Pro His Ala Ile Ala Arg Val Asp Met 170 175 Ala Gly Arg Asp Leu Thr Asp Tyr Leu Met Lys Ile Leu Ala Glu 190 195

Arg	Gly	Tyr	Thr	Phe 200	Ser	Thr	Thr	Ala	Glu 205	Arg	Glu	Ile	Val	Arg 210
Asp	Ile	Lys	Glu	Lys 215	Leu	Cys	Tyr	Val	Ala 220	Leu	Asp	Phe	Glu	
Glu	Ile	Gln	Thr	Ala 230	Ala	Gln	Ser	Ser	Ser 235	Leu	Glu	Lys	Ser	
Glu	Leu	Pro	Asp	Gly 245	Gln	Val	Ile	Thr	Ile 250	Gly	Asn	Glu	Arg	
Arg	Ala	Pro	Glu	Ala 260	Leu	Phe	Gln	Pro	Ser 265	Val	Leu	Gly	Leu	
Ser	Gly	Gly	Ile	His 275	Val	Thr	Thr	Phe	Asn 280	Ser	Ile	Met	Lys	
Asp	Val	Asp	Val	Arg 290	Lys	Asp	Leu	Tyr	Gly 295	Asn	Ile	Val	Met	
Gly	Gly	Thr	Thr	Met 305	Tyr	Pro	Gly	Leu	Ser 310	Asp	Arg	Met	Gln	
Glu	Ile	Thr	Ala	Leu 320	Ala	Pro	Ser	Ser	Met 325	Lys	Val	Lys	Ile	
Ala	Pro	Pro	Asp	Gly 335	Lys	Tyr	Ser	Val	Trp 340	Ile	Gly	Gly	Ser	
Leu	Ala	Ser	Leu	Ser 350	Thr	Phe	Gln	Gln	Met 355	Trp	Ile	Ser	Lys	
Glu	Tyr	Asp	Glu	Glu 365	Arg	Pro	Ser	Ile		His	Arg	Lys	Cys	

	5	8/1
Referencia del expediente del	5.4.5	Solicitud internacional nº
solicitante o del mandatario	PCT-40	

## INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO

(Regla 13 bis del PCT)

A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en					
pagina 22 .línea 16	5				
B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO Otros de					
Escherichia coli DH5X/pALfle07	pósitos están identificados en una hoja suplementaria				
Nombre de la institución de depósito Colección Española de Cultivos Ti	ine (CDCM)				
corección Espanora de Curtivos Ti	ipo (CECT)				
	<del></del>				
Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito pos	stal y el país)				
Universidad de Valencia					
Edificio de Investigación					
46100 BURJASOT (Valencia)					
Fecha de depósito	n° de orden				
20.02.1997	CECT 4849				
C. INDICACIONES SUPLEMENTARIAS (en caso necesario)	Se adjunta una hoja separada para				
	la continuación de estos datos	<u> </u>			
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITA	N LAS INDICACIONES				
ceaso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designado	180				
•					
•					
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (en	caso necesario)				
Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas p	osteriormente en la Oficina internacional (especificar la na	turaleza			
general de las indicaciones por ejem. "nº de orden del depósito")					
Reservado a la oficina receptora	Reservado a la Oficina internacional				
<u></u>					
Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la					
solicitud internacional	asa noja se na recioldo en la Orienia methacional	<b>~.</b> .			
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado				
(OP)	1				
	i				
· •	I				

58	12	

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario

PCT-40

Solicitud internacional nº

# INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO

(Regia 13 bis del PCT)

A Los indignations as a Samuel	
A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en página 28 ,línea 20	
B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO Otros de Escherichia coli DH5≺/pALP480	pósitos están identificados en una hoja suplementaria
Nombre de la institución de depósito	
Colección Española de Cultivos T	Cipo (CECT)
Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito por	stal y el país)
Universidad de Valencia	
Edificio de Investigación	
46100 Burjasot (Valencia)	
Fecha de depósito	n° de orden
20.02.1997	CECT 4852
C. INDICACIONES SUPLEMENTARIAS (en caso necesario)	Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITA	
(caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designado	N LAS INDICACIONES
·	
•	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (en	
E. Hydreactones solvings radas por separado (en	caso necesario)
Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas p	osteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza
general de las indicaciones por ejem. "nº de orden del depósito")	and the control of th
•	
Reservado a la oficina receptora	Reservado a la Oficina internacional
Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la	
Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional	Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado
	1
	i ·

		58/3	
Referencia del expediente del solicitante o del mandatario	PCT-40	Solicitud internacional n°	·
solicitante o dei mandatario		<u> </u>	

## INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO

(Regla 13 bis del PCT)

A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en	la descripción						
página33,línea14							
B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO Otros depósitos están identificados en una hoja suplementaria  Escherichia coli DH5%/pALP315							
Nombre de la institución de depósito	Nombre de la institución de depósito						
Colección Española de Cultivos Ti	po (CECT)						
Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito pos	stal y el país)						
Universidad de Valencia Edificio de Investigación							
46100 Burjasot (Valencia)							
Cooks de desérie							
Fecha de depósito 20-02-1997	n° de orden CECT 4851						
C. INDICACIONES SUPLEMENTARIAS (en caso necesario)	Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos						
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITA (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designado	N LAS INDICACIONES						
	<u>.</u>						
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (en	C3SO Decesario)						
general de las indicaciones por ejem. "nº de orden del depósito")	osteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza						
Reservado a la oficina receptora	Reservado a la Oficina internacional						
Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional	Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:						
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado						
	r uncionario autorizado						

, <del></del>	58/4
Referencia del expediente del	Solicitud internacional nº
solicitante o del mandatario PCT - 40	- South and the state of the st

# INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO

(Regla 13 bis del PCT)

A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en página 36línea	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·						
página <u>36</u> ,línea	26						
B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO Otros de							
Escherichia coli DH5x/pALC52	pósitos están identificados en una hoja suplementaria						
Nombre de la institución de depósito	n: (anam)						
Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)							
Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito pos	stal y el país)						
Universidad de Valencia							
Edificio de Investigación							
46100 Burjasot (Valencia)							
, and an analysis of the second secon							
Fecha de depósito	0.1						
20-02-1997	n° de orden CECT 4850						
C. INDICACIONES SUPLEMENTARIAS (en caso necesario)	Se adjunta una hoja separada para						
of 11/2101/01/01/20 001 EEMENTAKIAS (en caso necesario)	la continuación de estos datos						
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITA	N. L. A. C. INDICA CIONEC						
teaso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designado	N LAS INDICACIONES						
The state of the s							
·							
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (en	caso necesario)						
	100000000000000000000000000000000000000						
Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas p	osteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza						
general de las indicaciones por ejem. "nº de orden del depósito")							
, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,							
Reservado a la oficina receptora	Reservado a la Oficina internacional						
	Nosel vado a la Offettia internacional						
Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la	Translation 100 to 100						
solicitud internacional	Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:						
<u></u>							
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado						
(ADS)	i uncionatio autorizado						
	ŀ						
	1						

#### REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento para incrementar o bloquear la expresión génica en microorganismos caracterizado por expresar en dichos microorganismos genes, secuencias génicas parciales o fragmentos de ADN, bajo el control del promotor del gen gdh de Penicillium chrysogenum.
- 2.- Un procedimiento para incrementar o bloquear la expresión génica en microorganismos caracterizado por expresar en dichos microorganismos genes, secuencias génicas parciales o fragmentos de ADN, bajo el control del promotor del gen hex de Penicillium chrysogenum.
- 3.- Un procedimiento para la expresión extracelular de proteínas en microorganismos caracterizado por expresar en dichos microorganismos fusiones génicas con el gen hex de Penicillium chrysogenum.
- 4.- Un procedimiento para incrementar o bloquear la expresión génica en microorganismos caracterizado por expresar en dichos microorganismos genes, secuencias génicas parciales o fragmentos de ADN, bajo el control del gen act de Penicillium chrysogenum.
- 5.- Un procedimiento para incrementar o bloquear la expresión génica en microorganismos caracterizado por expresar en dichos microorganismos genes, secuencias génicas parciales o fragmentos de ADN, bajo el control del gen act de Acremonium chrysogenum.
- 6.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, donde el microorganismo transformado es un eucariota no humano, preferiblemente *Penicillium*, *Aspergillus o Acremonium*.

30

10

15

20

- 7.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, donde el microorganismo utilizado es preferentement Penicillium chrysogenum, Aspergillus nidulans o Acremonium chrysogenum.
- 8.- Un compuesto de ADN aislado de P. chrysogenum de 2811 pb acotado por los lugares de restricción Sau3AI y XbaI, el cual incluye el promotor del gen gdh.
- 9.- Un compuesto de ADN aislado de *P. chrysogenum* de 10 7737 pb acotado por los lugares de restricción BamHI y SacI, el cual incluye el promotor del gen hex.
  - 10.- Un compuesto de ADN aislado de *P. chrysogenum* de 4947 pb acotado por los lugares de restricción BglII y EcoRI, el cual incluye el promotor del gen act.
- 11.- Un compuesto de ADN aislado de A. chrysogenum de 8650 pb acotado por dos lugares de restricción HindIII, el cual incluye el promotor del gen act.
  - 12.- Una secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:1, la cual incluye el gen gdh de P. chrysogenum.
- 20 13.- Una secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:2, la cual incluye el gen hex de P. chrysogenum.
  - 14.- Una secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:3, la cual incluye el gen act de P. chrysogenum.
- 15.- Una secuencia de ADN identificada como SEQ ID
  25 NO:4, la cual incluye el gen act de A. chrysogenum.
  - 16.- Secuencias nucleotídicas hibridables bajo condiciones restrictivas con los compuestos de ADN de las reivindicaciones 8 a 15.
- 17.- Una secuencia de aminoácidos identificada como 30 SEQ ID NO:5, que se corresponde con la enzima glutamato deshidrogenasa de *P. chrysogenum*.

- 18.- Una secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO:6, que se corresponde con la enzima  $\beta$ -N-acetil-hexosaminidasa de P. chrysogenum.
- 5 19.- Una secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO: 7, que se corresponde con la proteína γ-actina de P. chrysogenum.
  - 20.- Una secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO: 8, que se corresponde con la proteína γ-actina de A. chrysogenum.
  - 21.- Vectores que portan los compuestos de ADN descritos en las reivindicaciones 8 a 16, ó fragmentos de los mismos.
- 22.- Vectores de acuerdo con la reivindicación 21, 15 caracterizados por consistir en un plásmido.
  - 23.- Plásmidos de acuerdo con la reivindicación 22, caracterizados por consistir en pALP784, pALP785 y pALfleo7.
- 24.- Plásmidos de acuerdo con la reivindicación 22,
  20 caracterizados por consistir en pALP295, pALP319, pALP377,
  pALP388 y pALP480.
  - 25.- Plásmidos de acuerdo con la reivindicación 22, caracterizados por consistir en pALP315 y pALP316.
- 26.- Plásmidos de acuerdo con la reivindicación 22, 25 caracterizados por consistir en pALC52 y pALC53.
  - 27.- Un procedimiento para la obtención de organismos transformados, no humanos, con una expresión incrementada de genes homólogos o heterólogos, caracterizado por comprender las siguientes operaciones:

- a) Construir vectores que porten, total o parcialmente, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o compuestos de ADN recombinante de las mismas.
- b) Introducir los vectores en organismos hospedadores no humanos obteniendo organismos transformados que expresen los genes homólogos o heterólogos.
  - c) Seleccionar los organismos transformados que presentan incrementada la expresión de los genes de homólogos o heterólogos cuando se comparan con organismos controles sin transformar.
  - 28.- Un procedimiento para la obtención de organismos transformados no humanos capaces de producir proteínas extra-celulares caracterizado por comprender las siguientes operaciones:
- 15 a) Construir vectores que porten, total o parcialmente SEQ ID NO: 2 ó compuestos de ADN recombinante de la misma.
  - b) Introducir los vectores en organismos hospedadores no humanos obteniendo organismos transformados que expresen y secreten al menos una proteína.
- 20 c) Seleccionar los organismos transformados capaces de secretar al menos una proteína en niveles superiores respecto de organismos controles sin transformar.
  - 29.- Un procedimiento para la obtención de organismos transformados, no humanos, con una expresión génica antisentido, bloqueando total o parcialmente su actividad, caracterizado por comprender las siguientes operaciones:
  - a) Construir vectores que porten, total o parcialmente, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o compuestos de ADN recombinante de las mismas.

...

- b) Introducir los vectores en organismos hospedadores no humanos obteniendo organismos transformados con expresión génica antisentido.
- c) Seleccionar los organismos transformados que presentan bloqueada total o parcialmente la expresión del gen cuando se comparan con organismos controles sin transformar.
- 30.- Procedimiento para la obtención de organismos transformados según la reivindicaciones 27 y 29, caracterizado porque los vectores utilizados son los definidos en las reivindicaciones 21 a 26, o se obtienen a partir de los mismos.
- 31.- Procedimiento para la obtención de organismos transformados según la reivindicación 28, caracterizado porque los vectores utilizados son los definidos en la reivindicación 24, o se obtienen a partir de los mismos.
- 32.- Procedimiento para la obtención de organismos transformados según las reivindicaciones 27 a 31, en que el organismo hospedador utilizado es un eucariota no humano, preferiblemente *Penicillium*, *Aspergillus o Acremonium*.
- 33.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 32, donde el microorganismo utilizado es preferentemente Penicillium chrysogenum, Aspergillus nidulans o Acremonium chrysogenum.
- 34.- Procedimiento para la obtención de organismos transformados según las reivindicaciones 27 a 31, en que el organismo hospedador utilizado es un procariota, preferentemente Escherichia coli o un actinomiceto.
- 35.- Organismos transformados, no humanos, caracterizados porque se les han introducido las secuencias de ADN de las reivindicaciones 8 a 16, incluidas total o parcialmente en los vectores de las reivindicaciones 21 a 26,

10

20

obtenibles por el procedimiento descrito en las reivindicaciones 27 a 34.

- 36.- Organismo transformado de acuerdo con la reivindicación 35, caracterizado por consistir en un procariota, preferentemente *Escherichia coli* o un actinomiceto.
- 37.- Organismo transformado de acuerdo con la reivindicación 35, caracterizado por consistir en un eucariota, preferentemente del género *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium o Saccharomyces*.
- 38.- Organismo transformado de acuerdo con la reivindicación 36, caracterizado por consistir preferentemente en Penicillium chrysogenum, Aspergillus nidulans, Acremonium chrysogenum o Saccharomyces cerevisiae.
- 39.- Organismo según la reivindicación 36, caracteri-15 zado por consistir en cepas puras representadas por CECT4849, CECT4852, CECT4851 y CECT4850 o sus mutantes y derivados transformados.
  - 40.- Utilización de los organismos transformados de las reivindicaciones 35 a 39, en la producción de antibióticos.
  - 41.- Utilización de los organismos transformados de las reivindicaciones 35 a 39, en la producción de penicilina.
- 42.- Utilización de los organismos transformados de las reivindicaciones 35 a 39, en la producción de cefalosporinas.

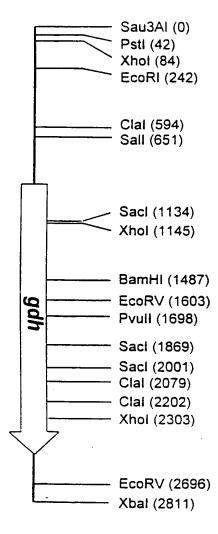


Figura 1

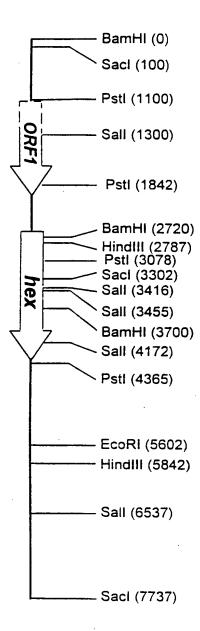


Figura 2

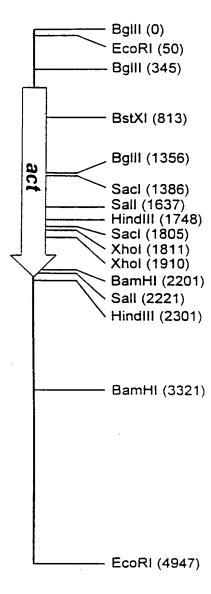


Figura 3

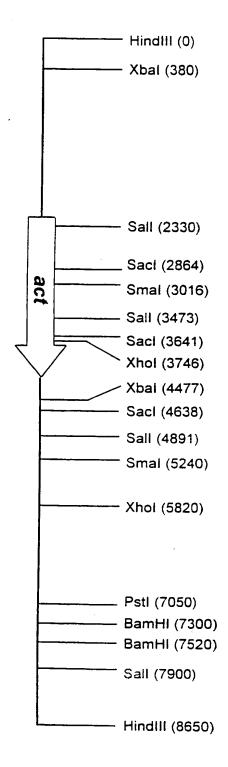


Figura 4

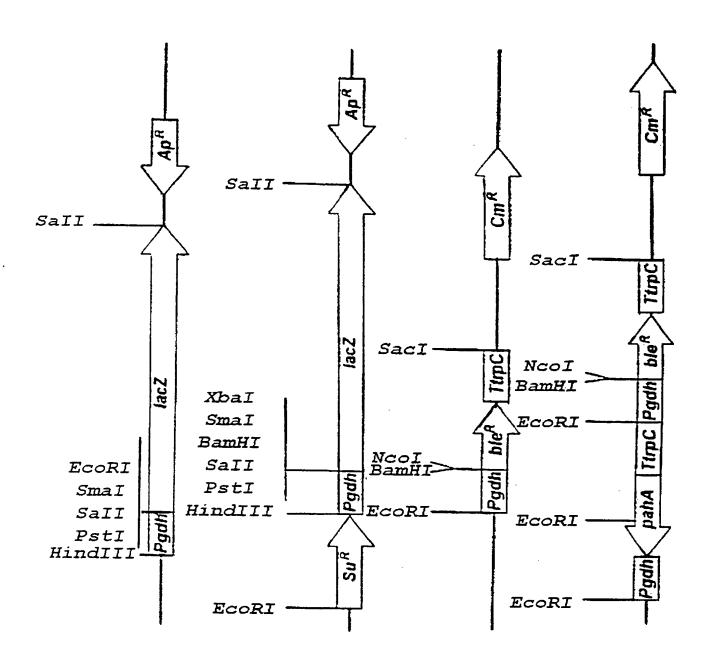


Figura 5

### **HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)**

WO 98/39459

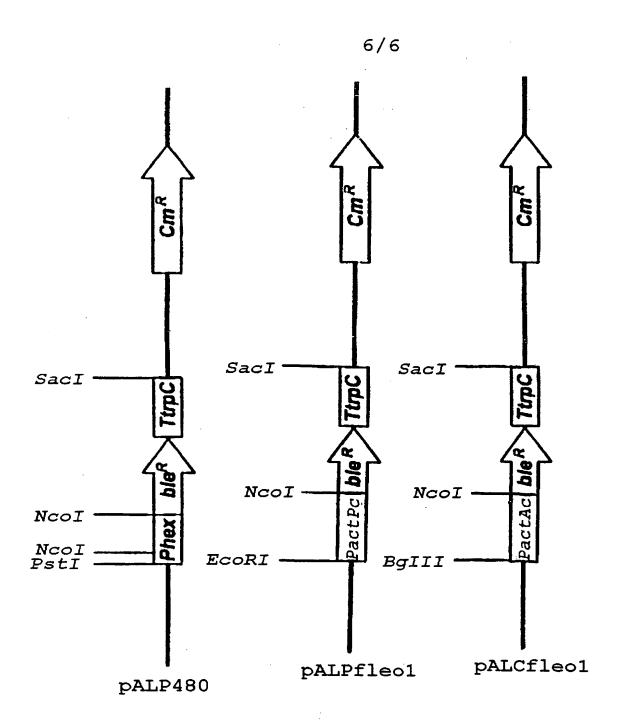


Figura 6

### **HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)**

International application No.

PCT/ES 98/00056

#### A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁶: C 12 N 15/80, 15/53 15/56, 9/06, 9/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

#### B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁶: C 12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## CIBEPAT, WPI, EPODOC, EMBASE, BIOSIS, CA, STRAND

<ul> <li>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVAN</li> </ul>	NT
-----------------------------------------------------------	----

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
х	BOGATI, M. et al. "NADP - specific glutamate dehydrogenase of Penicillium chrysogenum has a homohexamer structure", JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY, 1996, vol. 36. number 5, pages 371-375 see the whole document	17
x	SHEN, H-D et al. "Molecular cloning of CDNA coding for the 68 kda allergen of Pentcillium notatum using Mo Abs", CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, 1995, vol. 25, pages 350-356	9,13,16,18
Y	see the whole document	2,6,7,21,22,24 27,29-38,40,41
х	FIDEL, S. et al., "Aspergillus nidulans contains a single actin gene which has unique intron locations and encodes a gamma-actin", GENE, 1998, vol, pages 283-293	10,11,14,15,16,19,20
Y	see the whole document	4-7,21,22,25-27 29-38,40,41

X	Further documents are listed in the continuation of Box C.	X See patent family annex.
* "A" "E" "L" "O" "P"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance earlier document but published on or after the international filing date document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
Date	of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02	June 1998 (02.06.98)	18 June 1998 (18.06.98)
	e and mailing address of the ISA/P.T.O.	Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

International application No.
PCT/ES 98/00056

	PCT/ES 98/	00030
C (Continual	tion). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	<u> </u>
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0225078 A (PANLABS, INC.) 10 June 1987 (10.06.87) pages 3,4 page 6, line 23- page 7, line 23 claims, 1,2,4-6,8,9	1,6-8,16,21-23,27, 29-38,40,41
Y	EP 0215539 A (GLAXO GROUP LTD) 25.03.87 see the whole document	1,2,4-8,21-27,29- 38,40,41
A	JAKLITSCH, W.M. et al. "Glutamate pools and Glutamate dehydrogenase regulation in relation to Penicillin biosynthesis in strains of Penicillium chrysogenum", EXPERIMENTAL MYCOLOGY, 1985, vol. 9, pages 310-317	
A	FREDERICK, G.D. et. al. "Distant upstream regulatory sequences control the level of expression of the am (GDH) locus of Neurospora crassa", CURRENT GENETICS, 1990, vol. 18, pages 53-58.	
A	HAWKINS, A. R, et al. "Nucleotide sequence and regulation of expression of the Aspergillus nidulans gdh A gene encoding NADP dependent glutamate dehudrogenase", MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, 1989, vol. 218, pages 105-111	
A	POCSI, I. et al. "The formation of N-acetyl-beta-D- hexosaminidase is repressed by glucose in <i>Penicillium chrysosemum</i> ", J. BASIC MICROBIOL., 1993, vol. 33, number 4, pages 259-267	
P,X	GUTIERREZ, S. et al. "Expression of the cef G gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in Acremonium chrysogenum", APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., 1997, vol. 48, pages 606-614 see the whole document	1-41

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

International application No.

PCT/ES 98/00056

Box I	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)
This inte	rnational search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:
1.	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)
This Inte	ernational Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
see	the additional sheet
1. X	As all required additional search fees were fimely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
I,cmaii	No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

information on patent family members

International Application No
PCT/ES 98/00056

Patent document cited in search report	Publication date	Patent familiy member(s)	Publication date	
EP 0225078 A	10.06.87	FI 864473 A DK 552786 A JP 62151188 A	21.05.87 21.05.87 06.07.87	
EP 0215539 A	25.03.87	JP 61282086 A	12.12.86	
		~~~~~		

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº PCT/ ES 98/00056

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

 CIP^6 C 12 N 15/80, 15/53 15/56, 9/06, 9/24 De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación minima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP6 C 12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, WPI, EPODOC, EMBASE, BIOSIS, CA, STRAND

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	BOGATI, M. et al. "NADP - specific glutamate dehydrogenase of <i>Penicillium chrysogenum</i> has a homohexamer structure", JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY, 1996, vol. 36, número 5, páginas 371-375 ver el documento completo	17
X	SHEN, H-D et al. "Molecular cloning of CDNA coding for the 68 kda allergen of <i>Penicillium notatum</i> using Mo Abs", CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, 1995, Volúmen 25, páginas 350-356	9.13,16,18
Y	ver el documento completo	2,6,7,21,22,24 27,29-38,40,41
X	FIDEL, S. et al., "Aspergillus nidulans contains a single actin gene which has unique intron locations and encodes a gamma-actin", GENE, 1988, vol. 70, páginas 283-293	10,11,14,15,16,19.20
Y	Ver el documento completo	4-7,21,22,25-27 29-38,40,41

En la continuación del recuadro	C se relacionan otros documentos
---------------------------------	----------------------------------

Los documentos de familia de patentes se indican en el

- Categorias especiales de documentos citados:
- "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
- "E" documentos anterior publicado en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
- "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
- documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
- documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertunente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoria que constituye la base de la invención.
- documento particularmente relevante: la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
- documento particularmente relevante; la invención rejvindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 02.Junio 1998 (02.06.98)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 18 JUN 1998 (18. ns. 98) (**1** 8. os. 98)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

JOSÉ LUIS VIZÁN

Funcionario autorizado

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. n° de fax +34 1 3495304

nº de teléfono + 34 91 3495524

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (julio 1992)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 98/00056

Categoria *	Documentos citados, con indicacion, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Υ.	EP 0225078 A (PANLABS, INC.) 10.06.87 Páginas 3,4 Página 6, linea 23- Página 7, linea 23 Reivindicaciones, 1,2,4-6,8,9	1,6-8,16,21-23,27, 29-38,40,41
Y	EP 0215539 A (GLAXO GROUP LTD) 25.03.87 Ver el documento completo	1.2.4-8.21-27.29- 38.40.41
A	JAKLITSCH. W.M. et al. "Glutamate pools and Glutamate dehydrogenase regulation in relation to Penicillin biosynthesis in strains of <i>Penicillium chrysogenum</i> ". EXPERIMENTAL MYCOLOGY, 1985,vol. 9, paginas 310-317	
A	FREDERICK, G.D. et. al. "Distant upstream regulatory sequences control the level of expression of the am (GDH) locus of <i>Neurospora crassa</i> ", CURRENT GENETICS, 1990, vol. 18, pag. 53-58.	
A	HAWKINS, A. R., et al. "Nucleotide sequence and regulation of expression of the Aspergillus nidulans gdh A gene encoding NADP dependent glutamate dehudrogenase", MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, 1989, Volumen 218, paginas 105-111	
A	POCSI, I. et al. "The formation of N-acetyl-beta-D- hexosaminidase is repressed by glucose in <i>Penicillium chrysosenum</i> ", J. BASIC MICROBIOL., 1993, vol. 33, número 4, páginas 259-267	
P.X	GUTIERREZ. S. et al. "Expression of the cef G gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in Acremonium chrysogenum", APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., 1997, vol. 48, pag. 606-614 Ver el documento completo.	1-41
·		

Formulario PCT/ISA/210 (continuación de la segunda hoja) (julio 1992)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº PCT/ ES 98/00056

Recuadro I Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 1 de la primera hoja)
De conformidad con el articulo 17.2.2), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:
Las reivindicaciones nº5: se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. Las reivindicaciones nº1: se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. Las reivindicaciones nºs: son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).
Recuadro II Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 2 de la primera hoja)
La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:
Ver hoja adicional.
Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de busqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de busqueda.
2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza.
Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones nº:
4. Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones nº:
Indicación en cuanto a la reserva 🗵 Las tasas adicionales han sido acompañadas de una reserva por parte del solicitante.
El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna reserva.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n° PCT/ ES 98/00056

		1 C 17 E 3 98/00036	
Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
EP 0225078 A	10.06.87	FI 864473 A DK 552786 A JP 62151188 A	21.05.87 21.05.87 06.07.87
EP 0215539 A	25.03.87	JP 61282086 A	12.12.86

Formulario PCT/ISA/210 (anexo-familias de patentes) (julio 1992)